



(21)申請案號：106120359

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07D498/14 (2006.01)

(30)優先權：2016/06/20 日本 2016-121453

(71)申請人：鹽野義製藥股份有限公司(日本) SHIONOGI & CO., LTD. (JP)  
日本

(72)發明人：芝原攝也 SHIBAHARA, SETSUYA (JP)；福井伸明 FUKUI, NOBUAKI (JP)；牧利克 MAKI, TOSHIKATSU (JP)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：8 共 75 頁

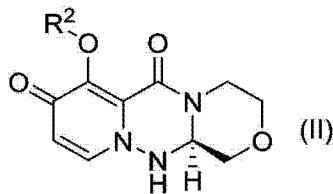
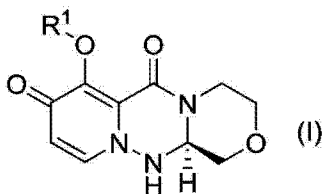
## (54)名稱

用於製備經取代多環吡啶酮衍生物之方法及其結晶

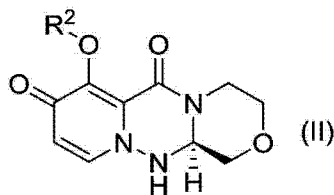
PROCESS FOR PREPARING SUBSTITUTED POLYCYCLIC PYRIDONE DERIVATIVE AND CRYSTAL THEREOF

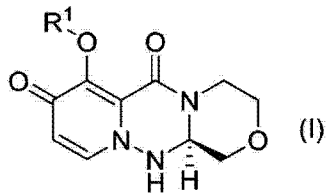
## (57)摘要

本發明提供一種用於製備式(II)之一化合物的方法：

其中 R<sup>2</sup> 為未經取代烷基，其特徵在於，在一鈉鹽及/或一鎂鹽的存在下使式(I)之一化合物與式：R<sup>2</sup>-OH，之一化合物反應：其中 R<sup>1</sup> 為氫，或不同於未經取代烷基之一保護基，其中 R<sup>2</sup> 係如以上所定義。

The present invention provides a process for preparing a compound of the formula (II):

wherein R<sup>2</sup> is unsubstituted alkyl, characterized by reacting a compound of the formula (I):



wherein  $R^1$  is hydrogen or a protecting group other than unsubstituted alkyl, with a compound of the formula:  
 $R^2$ -OH, wherein  $R^2$  is as defined above, in the presence of a sodium salt and/or a magnesium salt.

**【發明摘要】****【中文發明名稱】**

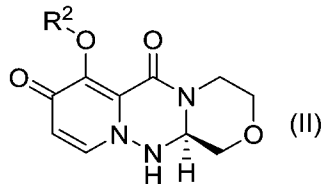
用於製備經取代多環吡啶酮衍生物之方法及其結晶

**【英文發明名稱】**

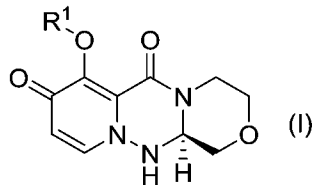
PROCESS FOR PREPARING SUBSTITUTED POLYCYCLIC PYRIDONE DERIVATIVE AND CRYSTAL THEREOF

**【中文】**

本發明提供一種用於製備式(II)之一化合物的方法：

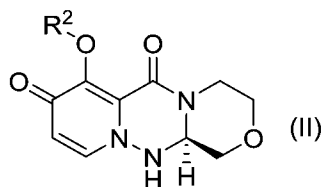
其中R<sup>2</sup>為未經取代烷基，

其特徵在於，在一鈉鹽及/或一鎂鹽的存在下使式(I)之一化合物與式：

R<sup>2</sup>-OH，之一化合物反應：其中R<sup>1</sup>為氫，或不同於未經取代烷基之一保護基，其中R<sup>2</sup>係如以上所定義。

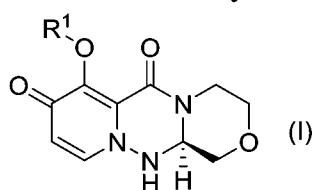
## 【英文】

The present invention provides a process for preparing a compound of the formula (II):



wherein R<sup>2</sup> is unsubstituted alkyl,

characterized by reacting a compound of the formula (I):



wherein R<sup>1</sup> is hydrogen or a protecting group other than unsubstituted alkyl,  
with a compound of the formula: R<sup>2</sup>-OH, wherein R<sup>2</sup> is as defined above, in the presence of a sodium salt and/or a magnesium salt.

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

用於製備經取代多環吡啶酮衍生物之方法及其結晶

## 【英文發明名稱】

PROCESS FOR PREPARING SUBSTITUTED  
POLYCYCLIC PYRIDONE DERIVATIVE AND  
CRYSTAL THEREOF

## 【技術領域】

### 【0001】發明領域

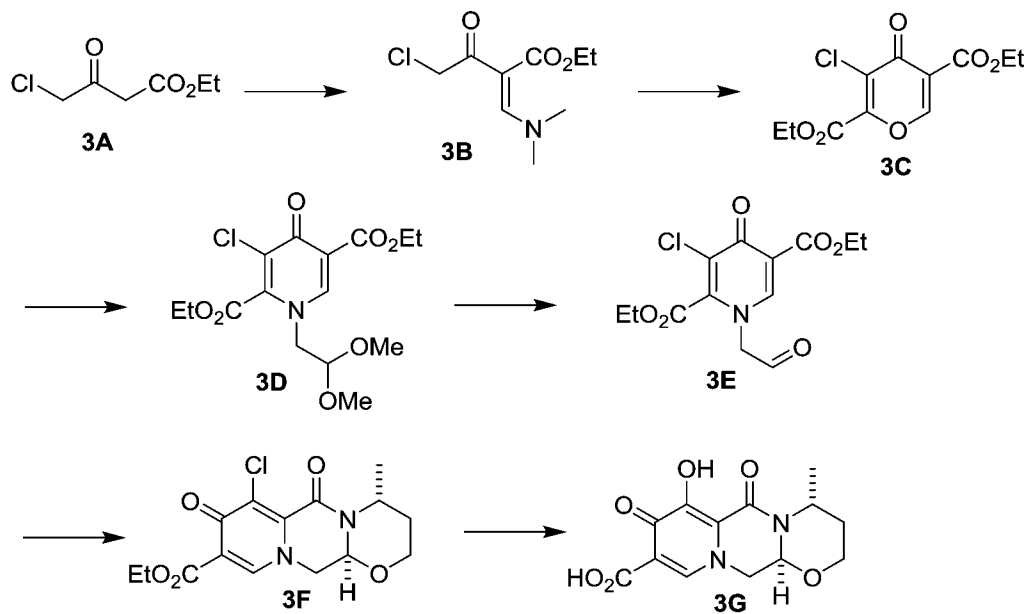
本發明係有關於一種用於製備經取代多環吡啶酮衍生物之方法及其結晶。具體而言，本發明係有關於一種用於製備具有帽依賴性(cap-dependent)核酸內切酶抑制活性之經取代多環吡啶酮衍生物之方法及其中間物。

## 【先前技術】

### 【0002】發明背景

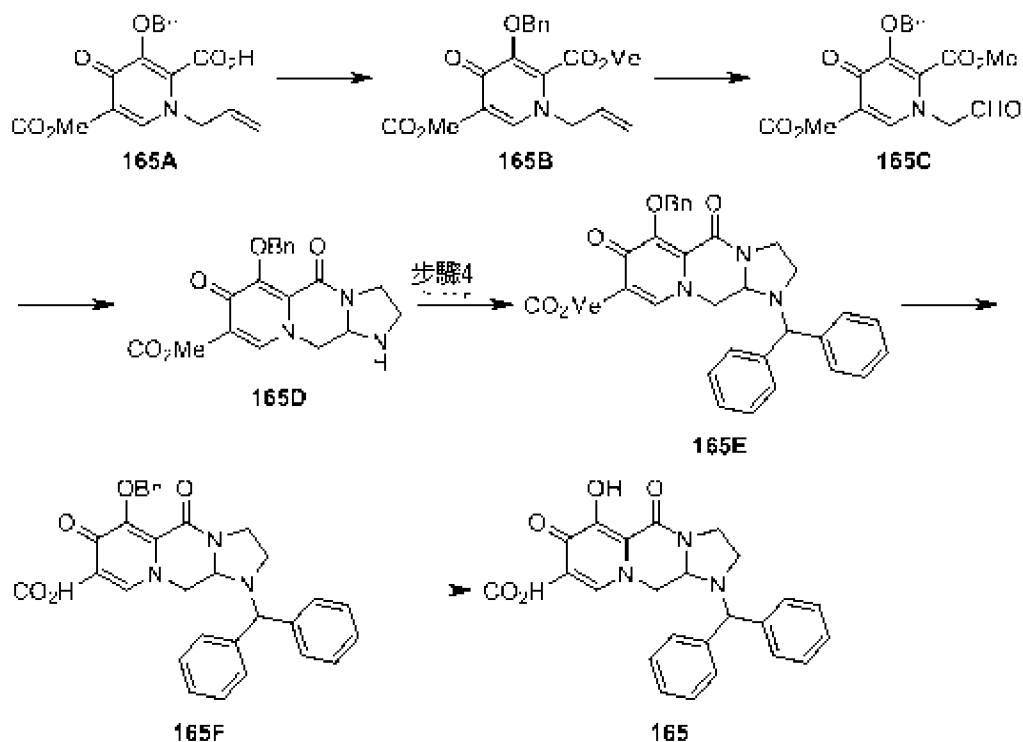
WO2010/110409(專利文獻1)揭露一種使用哌嗪衍生物或吡啶酮衍生物來製備多環吡啶酮衍生物之方法(實施例3)。

[化學式1]



WO2010/147068(專利文獻2)及WO2012/039414(專利文獻3)揭露一種使用吡啶酮衍生物來製備多環吡啶酮衍生物之方法(實施例165)。

[化學式2]

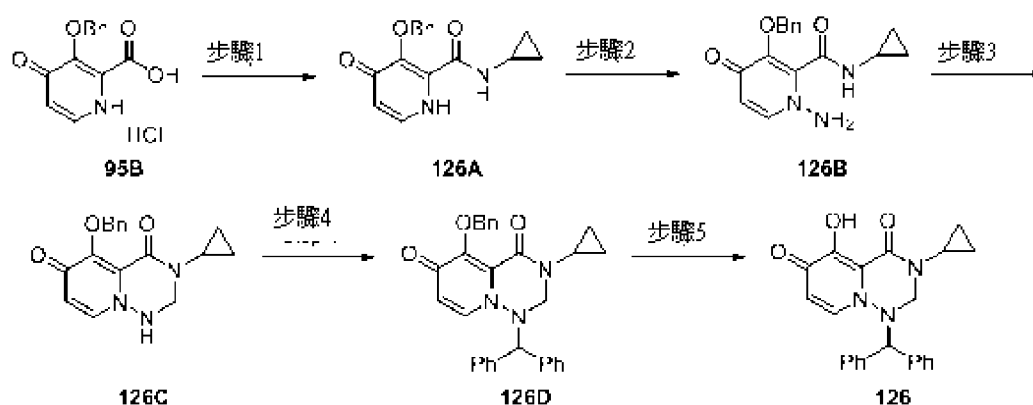


【0003】然而，專利文獻1至3沒有描述使用經苄基保

護的多環吡啶酮衍生物於光學活性多環吡啶酮衍生物與硫卓(thiepin)之偶合步驟中，降低了產物的光學純度。並且，專利文獻1至3中既沒有描述也沒有暗示，當使用己基保護的多環吡啶酮衍生物來進行偶合反應時，偶合反應在沒有降低光學純度的情況下產量良好地進行。進一步亦沒有描述也沒有暗示到，當該反應在鎂鹽存在下進行交換多環吡啶酮衍生物之保護基的反應，使得未經取代烷基以外之一保護基成為未經取代烷基時，該反應是以高產量方式進行且沒有降低光學純度。

【0004】專利文獻1揭露下列方法，其包含一種苄基保護的多環吡啶酮衍生物與二苯甲基衍生物之偶合步驟(實施例21)。然而，既沒有描述也沒有暗示在多環吡啶酮衍生物交換保護基的任何步驟。

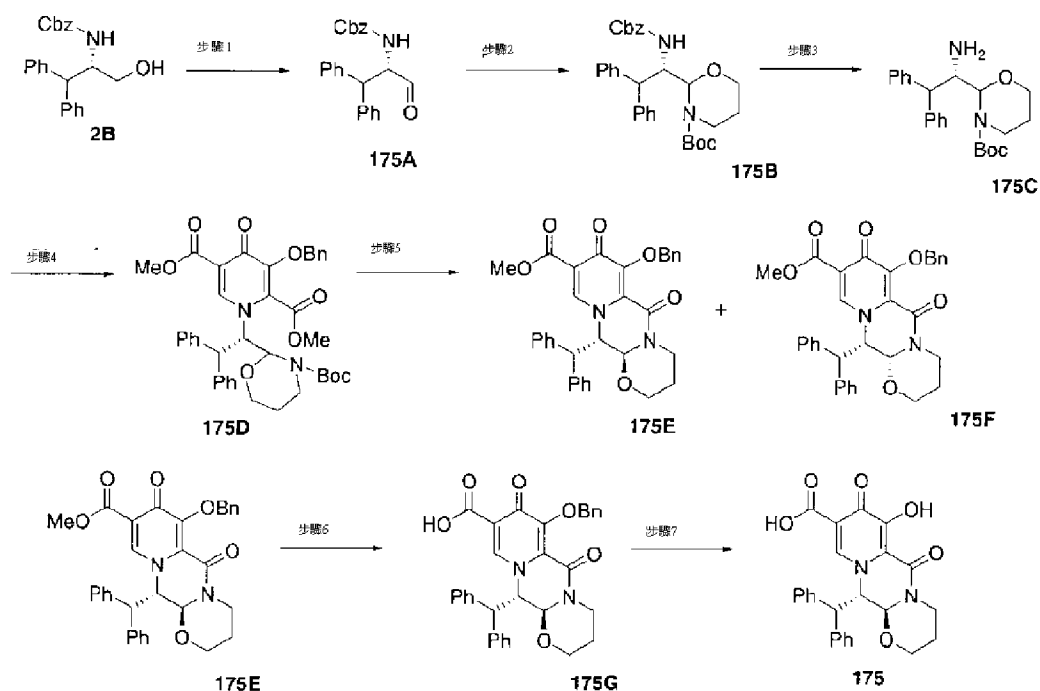
[化學式3]



專利文獻2揭露一種經取代三環吡啶酮衍生物與二苯甲基衍生物之偶合步驟(實施例175)。然而，既沒有描述也沒有暗示在三環吡啶酮衍生物交換保護基的任何步驟。

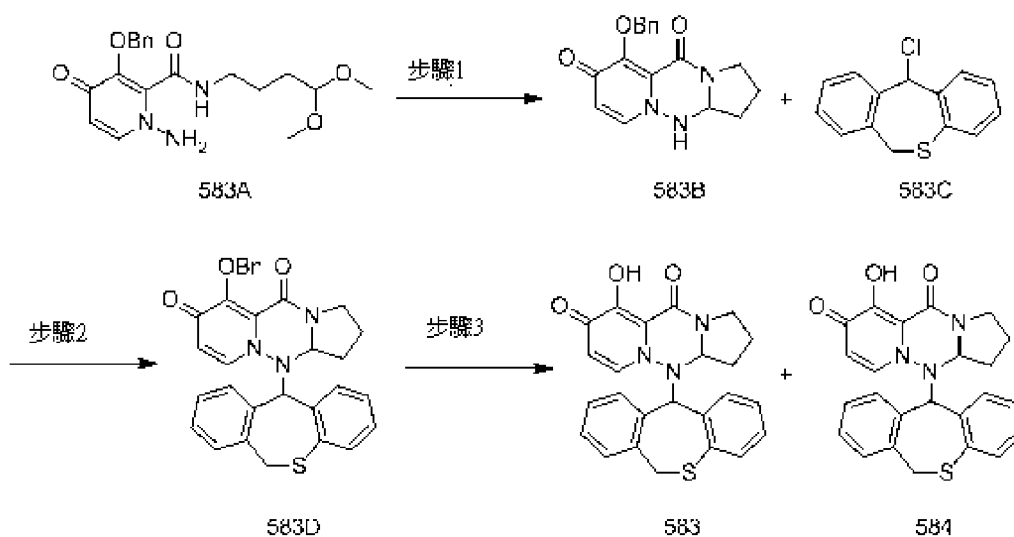
[化學式4]





專利文獻2揭露一種經取代三環吡啶酮衍生物與硫卓衍生物之偶合步驟(實施例583及584)。然而，既沒有描述也沒有暗示交換三環吡啶酮衍生物保護基或降低光學純度的任何步驟。

[化學式5]



[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】 WO2010/110409

WO2010/147068

WO2012/039414

**【發明內容】****【0006】發明概要**

[技術問題]

PCT/JP2016/63139描述該化合物，其為本文所揭示的式(V)或(VI)之化合物，具有帽依賴性核酸內切酶抑制活性且可用於作為由感染流行性感冒病毒所造成的症狀及/或疾病之治療及/或預防劑(**prophylactic agent**)。

本發明之一目的在於提供一種新穎且有用的方法用於製備具有帽依賴性核酸內切酶抑制活性之式(V)或(VI)之之經取代多環吡啶酮衍生物，以及式(II)或(IV)之中間物。

[問題解決方案]

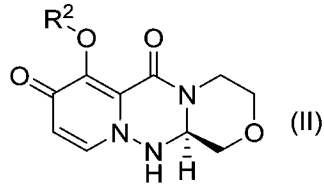
**【0007】**本發明人業已發現於一種光學活性經取代三環吡啶酮衍生物與一硫卓衍生物之偶合步驟中，發生了一種光學活性經取代環狀吡啶酮衍生物之光學純度的降低。

本發明人也已經發現一種於不造成光學純度降低的情況下完成一光學活性經取代三環吡啶酮衍生物與一硫卓衍生物之偶合反應的方法，其係藉由從不同於未經取代烷基之一保護基，例如苄基，交換成己基來進行。

本發明係有關於下列。

(1)一種用於製備式(II)之一化合物的方法：

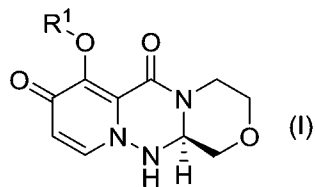
[化學式6]



其中 $R^2$ 為未經取代烷基，

其特徵在於，在一鈉鹽及/或一鎂鹽的存在下使式(I)之一化合物與式： $R^2-OH$ ，之一化合物反應：

[化學式7]



其中 $R^1$ 為氫，或不同於未經取代烷基之一保護基，

$R^2$ 係如以上所定義。

(2)如(1)之方法，其中該反應係於一鎂鹽的存在下進行。

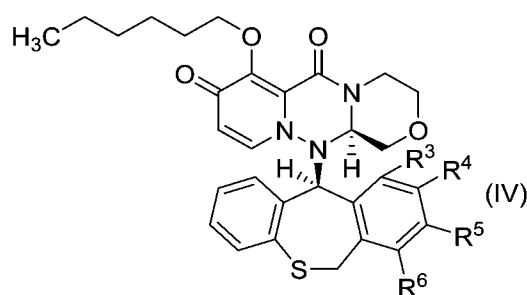
(3)如(1)之方法，其中該反應係於異丙基氯化鎂的存在下進行。

(4)如(1)至(3)中任一者之方法，其中 $R^1$ 為苄基。

(5)如(1)至(4)中任一者之方法，其中 $R^2$ 為己基。

(6)一種用於製備式(IV)之一化合物的方法：

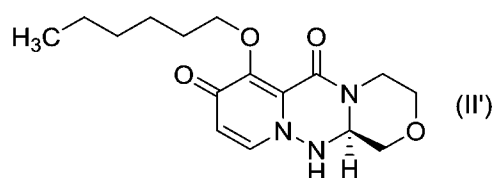
[化學式8]



其中 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 各自獨立地為氫或鹵素，但條件是 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 中之一者或二者為鹵素，

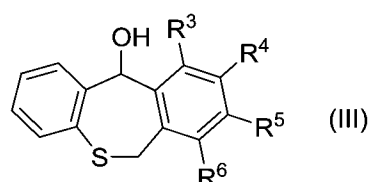
其特徵在於，使式(II')之一化合物：

[化學式9]



與式(III)之一化合物反應：

[化學式10]

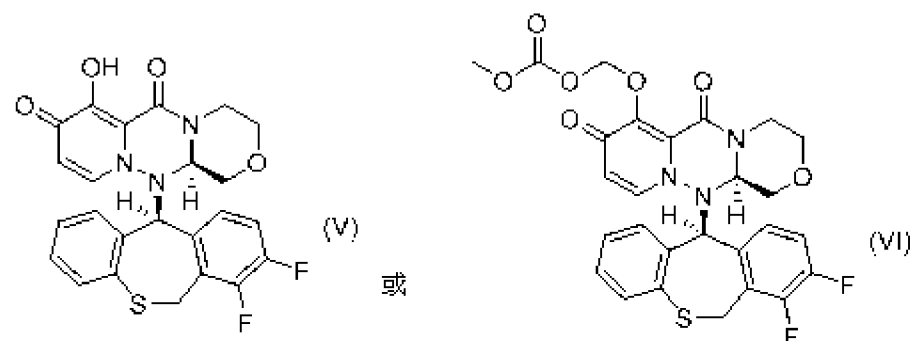


其中 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 係如以上所定義。

(7)如(6)之方法，其中 $R^3$ 為氫， $R^4$ 為氫， $R^5$ 為氟，以及 $R^6$ 為氟。

(8)一種用於製備式(V)或式(VI)之化合物的方法：

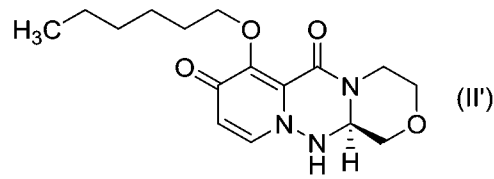
[化學式11]



其包含如(1)至(7)中任一者之方法。

(9)一種式(II')之化合物：

[化學式12]



或一其鹽。

(10)如(9)之化合物之鹽，其為一甲苯磺酸鹽。

(11)一種如(10)之鹽的結晶。

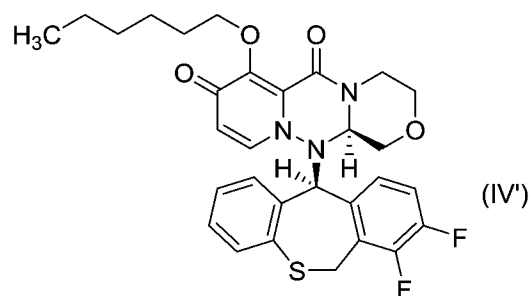
(12)如(11)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其中該至少二波峰之繞射角( $2\theta$ )係選自於下列所組成的群組： $5.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $11.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.1 \pm 0.2^\circ$ 及 $15.7 \pm 0.2^\circ$ 。

(13)如(11)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其包含波峰在 $5.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $11.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.1 \pm 0.2^\circ$ 及 $15.7 \pm 0.2^\circ$ 之繞射角( $2\theta$ )處。

(14)如(11)之結晶，其特徵在於基本上與圖4相同的一粉末X射線繞射光譜。

(15)一種式(IV')之化合物：

[化學式13]



或一其鹽。

(16)如(15)之化合物之鹽，其為一甲磺酸鹽

(mesylate)。

(17)一種如(16)之鹽的結晶。

(18)如(17)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其中該至少二波峰之繞射角( $2\theta$ )係選自於下列所組成的群組： $7.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $9.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $25.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $28.5 \pm 0.2^\circ$ 及 $37.8 \pm 0.2^\circ$ 。

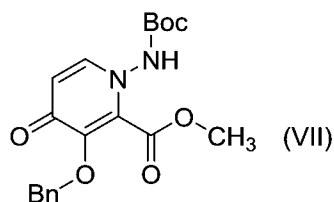
(19)如(17)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其包含波峰在 $7.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $9.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $25.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $28.5 \pm 0.2^\circ$ 及 $37.8 \pm 0.2^\circ$ 之繞射角( $2\theta$ )處。

(20)如(17)之結晶，其以微差掃描熱量法具有 $219^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 之熔點。

(21)如(17)之結晶，其特徵在於基本上與圖5相同的一粉末X射線繞射光譜。

(22)一種式(VII)之化合物：

[化學式14]



或一其鹽。

(23)一種如(22)之化合物的單水合物。

(24)如(23)之單水合物，其特徵在於一X射線粉末繞射

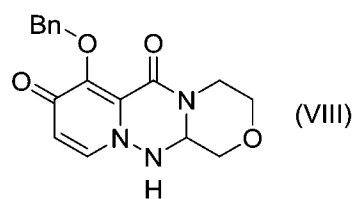
圖型，其中該至少二波峰之繞射角( $2\theta$ )係選自於下列所組成的群組： $5.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $7.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $11.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $20.2 \pm 0.2^\circ$ 及 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 。

(25)如(23)之單水合物，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其包含波峰在 $5.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $7.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $11.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $20.2 \pm 0.2^\circ$ 及 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 之繞射角( $2\theta$ )處。

(26)如(23)之單水合物，其特徵在於基本上與圖1相同的一粉末X射線繞射光譜。

(27)一種式(VIII)之化合物的溶劑合物：

[化學式15]



(28)一種式(VIII)之化合物的1/2水合物。

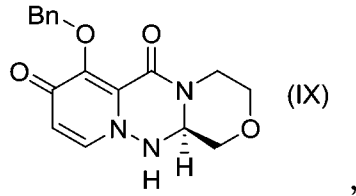
(29)如(28)之1/2水合物，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其中該至少二波峰之繞射角( $2\theta$ )係選自於下列所組成的群組： $9.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.0 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.5 \pm 0.2^\circ$ 及 $28.1 \pm 0.2^\circ$ 。

(30)如(28)之1/2水合物，其係特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其包含波峰在 $9.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.0 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.5 \pm 0.2^\circ$ 及 $28.1 \pm 0.2^\circ$ 之繞射角( $2\theta$ )處。

(31)如(28)之1/2水合物，其係特徵在於基本上與圖2相同的一粉末X射線繞射光譜。

(32)一種式(IX)之化合物：

[化學式16]



一其鹽或一其水合物。

(33)一種式(IX)之化合物之結晶。

(34)如(33)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其中該至少二波峰之繞射角(2θ)係選自於下列所組成的群組： $7.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.0 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.4 \pm 0.2^\circ$ 。

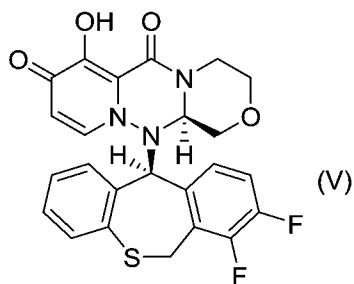
(35)如(33)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其包含波峰在 $7.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.0 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.4 \pm 0.2^\circ$ 之繞射角(2θ)處。

(36)如(33)之結晶，其係特徵在於基本上與圖3相同的一粉末X射線繞射光譜。

(37)一種式(V)之化合物的結晶：

[化學式17]





或一其藥學上可接受的鹽之一結晶。

(38)如(37)之結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其中該至少二波峰之繞射角( $2\theta$ )係選自於下列所組成的群組： $9.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.5 \pm 0.2^\circ$ 及 $24.8 \pm 0.2^\circ$ 。

(39)如(37)之化合物的結晶，其特徵在於一X射線粉末繞射圖型，其包含波峰在 $9.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.5 \pm 0.2^\circ$ 及 $24.8 \pm 0.2^\circ$ 之繞射角( $2\theta$ )處。

(40)如(37)之化合物的結晶，其係特徵在於基本上與圖6相同的一粉末X射線繞射光譜。

**【0008】** 依據本發明之方法，一種式(V)或(VI)之多環吡啶酮衍生物可以以高光學純度且有效率地製備。

### **【圖式簡單說明】**

**【0009】** 圖1為化合物3之粉末X射線繞射圖型。

圖2為化合物9之粉末X射線繞射圖型。

圖3為化合物13之粉末X射線繞射圖型。

圖4為化合物20之甲苯磺酸鹽的粉末X射線繞射圖型。

圖5為化合物21之甲磺酸鹽的粉末X射線繞射圖型。

圖6為化合物(V)之粉末X射線繞射圖型。

圖7係於非禁食條件下經口投與式(V)之化合物之前驅藥式(VI)之化合物至大鼠後，式(V)之化合物之血漿內濃度的時間過程。

圖8係於非禁食條件下經口投與式(V)之化合物之前驅藥式(VI)之化合物至大鼠後，式(VI)之化合物之血漿內濃度的時間過程。

### 【實施方式】

#### 【0010】較佳實施例之詳細說明

以下說明使用於本文中之術語的意義。除非另有具體解釋，否則各術語於單獨或與其他術語組合使用時均具有相同的含義。

術語「由~組成」意指僅具有所述元件。

術語「包含」意指不限定於所述元件且不排除未記載之元件。

「鹵素」包括氟、氯、溴或碘。氟及氯為較佳的，以及氟為特別佳的。

【0011】術語「烷基」意指C1至C6直鏈或支鏈烷基，以及包括C1至C4烷基，C1至C3烷基等等。實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、二級丁基、三級丁基、正戊基、異戊基、新戊基、己基、異己基等。

$R^1$ 之不同於未經取代烷基的保護基之實例包括苄基。

$R^2$ 之未經取代烷基之實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、二級丁基、三級丁基、正戊基、異戊基、新戊基、己基及異己基；以及正丙基、異丁基、

己基等為較佳的；以及己基為特別佳的。

【0012】「不同於未經取代烷基之保護基」沒有限制只要其為不同於以上「烷基」之保護基並且其在鈉鹽及/或鎂鹽的存在下被移去。實例包括經取代烷基等等，較佳為苄基等等。

【0013】「鈉鹽」沒有限制只要其能移去「不同於烷基之保護基」。實例包括氫氧化鈉、氫化鈉、異丙基氧化鈉、叔戊氧基鈉、異丙基氯化鎂等。較佳為叔戊氧基鈉及異丙基氯化鎂，以及異丙基氯化鎂為特別佳的。

【0014】 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 以及「鈉鹽及/或鎂鹽」之較佳具體例係說明如下。具有下列具體例之可能組合的化合物為較佳的。

$R^1$ 包括氫或不同於未經取代烷基之一保護基。於較佳具體例中， $R^1$ 為不同於未經取代烷基的保護基，以及苄基為特別佳的。

$R^2$ 包括未經取代烷基。於較佳具體例中， $R^2$ 包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、二級丁基、三級丁基、正戊基、異戊基、新戊基、己基、異己基等，以及正丙基、異丁基、己基等為較佳的，以及己基為特別佳的。

於較佳具體例中，「鈉鹽及/或鎂鹽」較佳為「鎂鹽」，以及異丙基氯化鎂、環己基氯化鎂等為較佳的，以及異丙基氯化鎂為特別佳的。

$R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 各自獨立地為氫或鹵素，以及 $R^3$ 、 $R^4$ 、

$R^5$ 及 $R^6$ 中之一者或二者為鹵素。

於較佳具體例中， $R^3$ 為氫。

於較佳具體例中， $R^4$ 為氫。

於較佳具體例中， $R^5$ 為氟。

於較佳具體例中， $R^6$ 為氟。

**【0015】**於本說明書中，使一化合物與一化合物反應包括使此化合物的鹽類或其溶劑合物反應。

**【0016】**本發明的化合物之藥學上可接受的鹽類包括具有鹼金屬(例如，鋰、鈉、鉀等)、鹼土金屬(例如，鈣、鋇等)、鎂、過渡金屬(例如，鋅、鐵等)、氨、有機鹼(例如，三甲胺、三乙胺、二環己基胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、葡甲胺、乙二胺、吡啶、甲基吡啶、喹啉等)或胺基酸之鹽，或者具有無機酸(例如，鹽酸、硫酸、硝酸、碳酸、氫溴酸、磷酸、氫碘酸等)，或有機酸(例如，甲酸、乙酸、丙酸、三氟乙酸、檸檬酸、乳酸、酒石酸、草酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、苦杏仁酸、戊二酸、蘋果酸、苯甲酸、苯二甲酸、抗壞血酸、苯磺酸、對甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸等)之鹽，尤其是，具有鹽酸、硫酸、磷酸、酒石酸、甲磺酸等之鹽。此等鹽類可依照常用的方法而形成。

式(V)之化合物之藥學上可接受的鹽之實例包括具有鹼金屬(例如，鋰、鈉、鉀等)、鹼土金屬(例如，鈣、鋇等)、鎂、過渡金屬(例如，鋅、鐵等)之鹽，以及具有鹼金屬(例如，鋰、鈉、鉀等)之鹽及具有鹼土金屬(例如，鈣、鋇等)

之鹽為較佳的。

【0017】本發明的化合物或其藥學上可接受的鹽類可形成一種溶劑合物，例如水合物，及/或結晶多晶型，以及本發明包括此等各種溶劑合物及結晶多晶型。「溶劑合物」可以為對本發明之化合物配位任意數量的溶劑分子(例如水分子等)之該等。當讓本發明的化合物或其藥學上可接受的鹽類放置於大氣中時，其可吸收水，導致吸附的水附著或者形成水合物之情形。此外，本發明的化合物或其藥學上可接受的鹽類可以予以再結晶以形成結晶多晶型。

【0018】一種用於特徵化本發明之結晶的方法係闡述如下。除非另有說明，否則本說明書及申請專利範圍內之數值為大概之值。數值之變動可能因裝置校正、裝置誤差、物質純度、結晶尺寸、樣本尺寸及其他因素所引起。

【0019】使用於本文中之術語「結晶」係指具有規律地長範圍分子構造的物質。結晶型式之結晶性程度(*degree of crystallinity*)可藉由包括，舉例而言，粉末X射線繞射、水分吸附、微差分析、熱量分析、溶液比色法、溶解性質之諸多技術而進行測定。

【0020】一般而言，結晶有機化合物包含於3維空間內週期性地排列之大量原子。結構週期性通常表現出可利用大部分之分光學探針(例如X射線繞射、紅外光譜、拉曼光譜及固態NMR)而明確地區分之物理特性。

其中，粉末X射線繞射(XRPD)係用以測定固體之結晶性之感度最良好之方法之一。對結晶照射X射線，則於晶

格面進行反射並相互干涉。於是，僅滿足利用布勒格定律 (Bragg's law) 所預測之條件之方向的繞射線強度增大，且有序繞射線 (order diffraction lines) 強度會相抵消而未被觀測到。另一方面，對於非晶質固體，並沒有發現廣範圍的有序繞射線。非晶質固體因為不具備長範圍的有秩序之重複晶格，故而通常呈現通稱暈圖案 (halo pattern) 的較寬 XRPD 圖案。

【0021】本說明書所揭示之多環吡啶酮衍生物、中間物、其鹽及/或其溶劑合物之結晶型式較佳具有可區分的 X 射線粉末繞射輪廓。舉例而言，式(V)之化合物之結晶型式較佳能依照特徵性繞射波峰的存在而區分。使用於本文中之特徵性繞射波峰係從所觀察到繞射圖案中選擇的該等。特徵性波峰較佳係選自繞射圖案中之約二十個波峰、更佳為約十個波峰，且最佳為約五個波峰。

【0022】一般而言，已知於以下之表及圖中所表示之各種波峰之相對強度可因諸多因素，例如結晶對於 X 射線束之配向之效果、所分析之物質之純度或樣本之結晶性程度而變動。波峰位置亦會於樣品高度的變動而位移。進而，使用不同之波長而進行測定，則根據布勒格公式 (Bragg equation) ( $n\lambda = 2d \sin \theta$ ) 可獲得不同之位移。此種藉由使用不同之波長而獲得之不同之 XRPD 圖案亦包括於本發明之範圍中。

【0023】本發明之結晶型式可利用熱分析予以特徵化。

**DSC(微差掃描熱量法)**

DSC為熱分析之主要測定方法之一並且為一種測定作為原子/分子之集合體的物質之熱性質的方法。可藉由DSC來測定藥學活性成分相對於溫度或時間的熱容量變化，以及繪製所獲得數據對溫度或時間的圖，便可獲得微差掃描熱量法曲線。從微差掃描熱量法曲線可獲藥學活性成分之開始溫度、吸熱最大值及熔化焓之資訊。

**【0024】(本發明的化合物之製備)**

本發明的化合物之通常製備方法係例示如下。再者，萃取、純化等可以用有機化學實驗中進行之慣用方法來進行。

本發明的化合物之合成可參考本技藝中公知之方法來進行。

**【0025】**市售之化合物、本說明書中所述之化合物、本說明書中所引用之文獻中所述之化合物及其他之公知化合物可使用作為原料化合物。

設若欲取得本發明之化合物的鹽，本發明之化合物以鹽的形式獲得的情形下，可以予以純化。於該化合物以游離的形式獲得之情形下，只要溶解或懸浮於適當的有機溶劑中且添加酸或鹼以藉由通常之方法形成鹽。

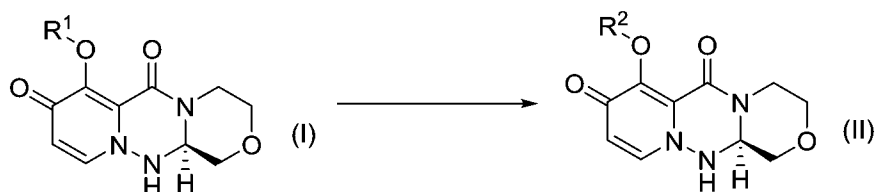
此外，本發明的化合物及其藥學上可接受的鹽類可以以與水或各種溶劑之加成物(水合物或溶劑合物)之形態存在。此等加成物亦包括於本發明中。

**【0026】楔形及虛線表示絕對構形。**

【0027】本發明的方法可以舉例而言，進行如下。

步驟1

[化學式18]



其中 $R^1$ 為氫或不同於未經取代烷基之一保護基且 $R^2$ 為未經取代烷基。

於此步驟中，在一鈉鹽及/或一鎂鹽的存在下使式(I)之化合物與式： $R^2-OH$ 之一醇反應，以提供式(II)之化合物。

溶劑沒有限制只要其允許以上方法有效地進行。此等溶劑之實例包括二氯甲烷、甲苯、四氫呋喃等，其可以單獨或組合使用。該方法可以於混合溶劑中之單者或在沒有溶劑的情況下進行。較佳的溶劑為四氫呋喃。

鈉鹽及/或鎂鹽之實例包括氫氧化鈉、氫化鈉、異丙基氧化鈉、叔戊氧基鈉、異丙基氯化鎂、環己基氯化鎂等。較佳為異丙基氯化鎂。該鹽可以以對化合物(I)為0.1至5莫耳當量，較佳為0.3至0.5莫耳當量的量來使用。

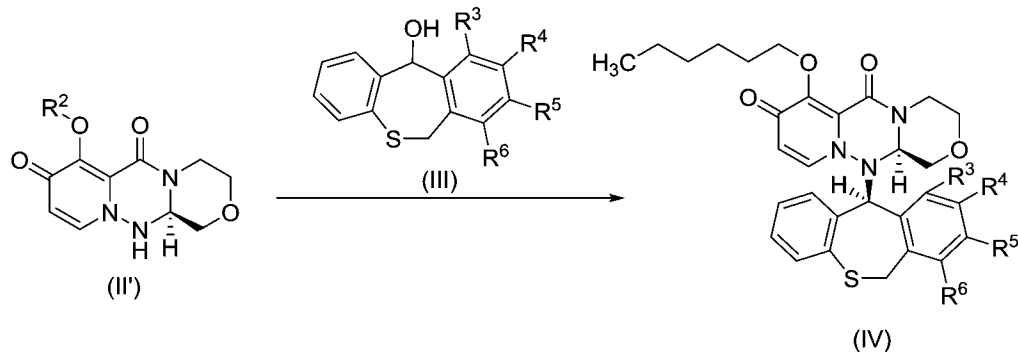
反應溫度沒有限制，但反應通常可於大約0至100°C，較佳為於0°C至室溫下進行。

反應時間沒有限制，但反應通常可進行0.5小時至24小時，較佳為1至10小時。

【0028】步驟2



## [化學式19]



其中 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 各自獨立地為氫或鹵素，但條件是 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 中之一者或二者為鹵素。其他符號係如以上所定義。

於此步驟中，在一縮合劑的存在下使式(II')之化合物與式(III)之化合物反應以獲得式(IV)之化合物。

溶劑沒有限制只要其允許以上步驟有效地進行。溶劑之實例包括乙酸乙酯、環己烷、乙酸異丙酯、乙酸丙酯、甲苯、1,4-二噁烷、DMA、DMF、甲苯、庚烷、環戊基甲醚等，其可以單獨或組合使用。該反應可以於混合溶劑中之單者或在沒有溶劑的情況下進行。較佳的溶劑為乙酸乙酯及環己烷的混合溶劑。

縮合劑之實例包括丙基磷酸酐、甲磺酸、三氟乙酸、對甲苯磺酸單水合物、10-樟腦磺酸、濃硫酸、二氯乙酸、四甲基硫酸氫銨等等，以及其等可以單獨或組合使用，較佳地，丙基磷酸酐及甲磺酸的混合物。該縮合劑可以以對化合物(II')為1至5莫耳當量，較佳為1至3莫耳當量的量來使用。

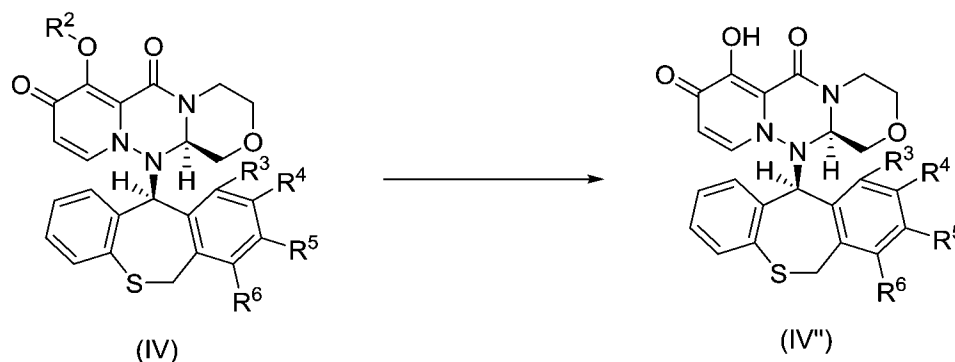
反應溫度沒有特別限制，但反應通常可於大約0至100

°C，較佳為於0°C至室溫下進行。

反應時間沒有限制，但反應通常可進行0.5小時至24小時，較佳為1至10小時。

### 【0029】步驟3

[化學式20]



其中變數係如以上所定義。

於此步驟中，使式(IV)之化合物與金屬鹽反應以獲得式(IV'')之化合物。

溶劑沒有限制只要其允許以上方法有效地進行。此等溶劑之實例包括N-甲基吡咯啉酮、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺等，其可以單獨或組合使用。較佳的為N-甲基吡咯啉酮。

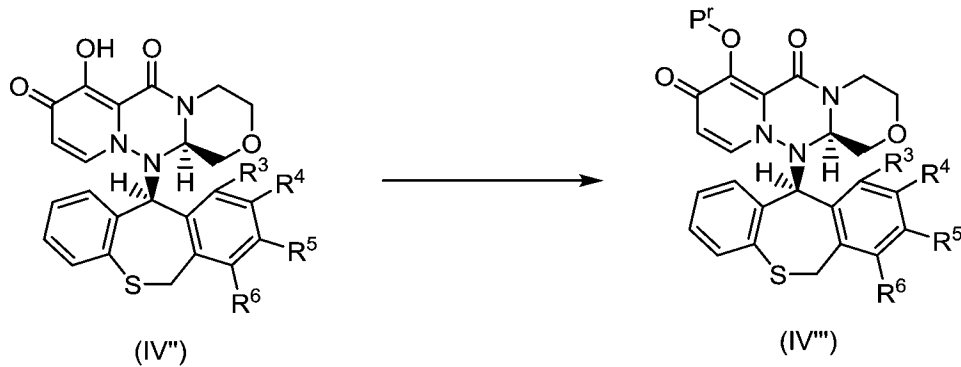
金屬鹽之實例包括氯化鋰及溴化鋰等，以及氯化鋰為較佳的。該金屬鹽可以以對化合物(IV)為1至20莫耳當量，較佳為5至10莫耳當量的量來使用。

反應溫度沒有特別限制，但反應通常可於大約0至100°C，較佳為於室溫至100°C下進行。

反應時間沒有限制，但反應通常可進行0.5小時至48小時，較佳為12至24小時。

## 【0030】步驟4

[化學式21]

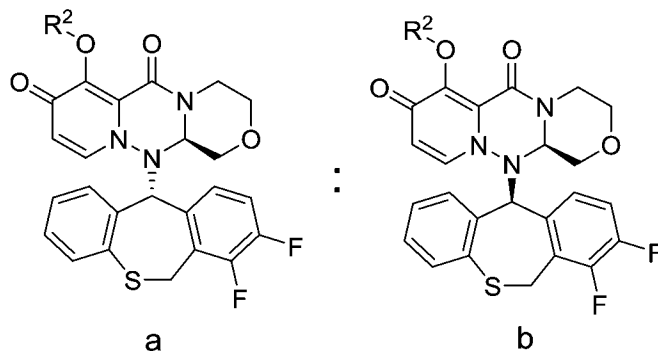


其中P<sup>r</sup>為一羥基基團例如酯基或醚基之保護基，以及其他變數係如以上所定義。

於此步驟中，可按照用於轉化化合物(IV'')的羥基基團成酯基或醚基之慣用方法來獲得化合物(V''')。此方法之實例可以於 *Protective Groups in Organic Synthesis*, Theodora W Green (John Wiley & Sons), Prog. Med 5: 2157-2161 (1985) 及大英圖書館提供的-"The world's Knowledge"中找到。

當使用於本文中，「非鏡相異構物比例」係指以下顯示的二種鏡相異構物之HPLC面積百分比的比例。

[化學式22]



【0031】式(V)之化合物係對流行性感冒病毒所誘發

的症狀及/或疾病有用。舉例而言，對於涉及發熱、受寒、頭痛、肌肉痛及全身無足輕重感覺的感冒症狀，氣管炎如咽頭痛、鼻涕、鼻塞、咳嗽、痰，胃腸症狀如胃痛、嘔吐、腹瀉，再者，涉及二次感染的伴發性疾病如急性腦症、肺炎，之治療、預防及/或症狀緩解上為有效。

式(VI)表示的化合物因具有例如口服吸收性高、良好的生體可用率、良好的清除率、肺移行性高等優點，其可成為優異的藥物。

式(V)表示的化合物因具有對帽依賴性(cap-dependent)核酸內切酶，其為病毒特異性酵素，之抑制活性較高，且因而具有高特異性功效，所以可成為副作用減輕的藥物。

再者，式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物在代謝安定性方面很優異、溶解度高、口服吸收性高、良好的生體可用率、良好的清除率、肺轉移性高、半衰期長、非蛋白質結合率高、hERG通道抑制低、CYP抑制低、CPE(細胞病變作用)抑制效果及/或其於光毒性試驗、安氏試驗(Ames test)、遺傳毒性試驗亦為陰性的優點，或不具有毒性例如肝傷害。因此，式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物可成為優異的藥物。

**【0032】** 式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物可以藉由經口或注射(parenteral)投與。關於經口投與，式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物可以通常調配物之任一形式來使用，舉例而言，例如錠劑、粉末、顆粒、膠囊之固體

形式調配物；水性調配物；油性懸浮劑；糖漿劑或者酞劑等之液體形式調配物。關於注射投與，式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物可以使用水性或油性懸浮注射劑或滴鼻劑之形式。於製備此調配物時，可選擇性使用慣用之賦形劑、結合劑、潤滑劑、水性溶劑、油性溶劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、安定劑等。一種包含式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物之藥學組成物可以經由組合(例如摻合)治療有效量之式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物及藥學上可接受的載劑或稀釋劑而製備。

關於經口投與，式(V)之化合物及/或式(VI)之化合物之每日劑量可以為成人每天大概0.05-3000mg，較佳為大概0.1-1000 mg，而此劑量取決於為此之投與途徑、病患之年齡、體重、狀態及病患之疾病而變化。必要時劑量可分開投與。於注射投與之情形時，成人之每日劑量可以為介於大概0.01-1000 mg，較佳為大概0.05mg-500 mg之間。

#### [實施例]

**【0033】** 本發明參照實施例、參考實施例、中間物製備實施例以及測試實施例而更詳細地進行說明，但本發明並限於此等實施例。

**【0034】** 參考實施例及實施例中之NMR分析係於400 MHz下，使用DMSO-d<sub>6</sub>、CDCl<sub>3</sub>進行。

#### **【0035】** 粉末X射線繞射圖型

各實施例中所獲得的結晶之粉末X射線繞射分析係依

據日本藥典之一般試驗法中之粉末X射線繞射分析方法，  
於以下之條件下進行。

**【0036】(裝置)**

MinFlex600 RINT-TTRIII (Rigaku)

(方法)

檢測器：高速一維檢測器(D/TecUltra 2)及可變刀刃

測定法：反射法

光源之種類：Cu球管

工作波長：CuK $\alpha$ 射線

管電流：10 mA或15 mA

管電壓：30 Kv或40 Kv

樣本板：鋁或玻璃

X射線入射角( $\theta$ )：3-40°，樣本寬度：0.01°，或

X射線入射角( $\theta$ )：4-40°，樣本寬度：0.02°

一般而言，既然粉末X射線繞射的繞射角( $2\theta$ )可涉及 $\pm 0.2^\circ$ 內的誤差，那麼繞射角的值會含括大約 $\pm 0.2^\circ$ 範圍內的數值。所以，本發明不僅含括粉末X射線繞射的波峰繞射角完全呈一致的結晶，而且還有波峰繞射角與大約 $\pm 0.2^\circ$ 誤差呈一致的結晶。

**【0037】(以卡耳費雪法(Karl Fischer Method)測量水含量)**

水含量係依據日本藥典之水測定一般試驗法(庫侖滴定)予以判定。使用 Aquamicron<sup>TM</sup> AX(Mitsubishi Chemical Corporation)作為陽極電解液溶液，以及使用

Aquamicon™ CXU作為陰極電解液溶液。

一般而言，卡耳費雪法進行之水含量測量可涉及 $\pm 0.3\%$ 範圍內的誤差。於是，測量時特定值的水含量應該包含 $\pm 0.3\%$ 範圍內的任何數值。

#### 【0038】TG/DTA測量

各實施例中所獲得之結晶進行TG/DTA測量。於鋁鍋中稱取樣本並於開放系統中進行測定。測量條件顯示如下。

裝置：TG/DTA 7200 (Hitachi High-Tech Science)

測定溫度範圍：30°C -250°C

加熱速率：10°C/min

一般而言，TG/DTA測量可涉及 $\pm 2^\circ\text{C}$ 範圍內的誤差。於是，測量時特定值應該包含 $\pm 2^\circ\text{C}$ 範圍內的任何數值。

#### 【0039】動態蒸汽吸附(DVS)

各實施例中所獲得之結晶進行動態蒸汽吸附分析。於樣本鍋中稱取樣本並於如下條件下測定。

裝置：DVS Advantage(Surface Measurement Systems Ltd.)

測定點：自0%RH以5%步進至95%RH，繼而95%RH以每5%步進至0%RH

溫度：25°C 或60°C

#### 【0040】微差掃描熱量法(DSC)測量

各實施例中所獲得之結晶進行DSC測量。於密封的不鏽鋼鍋中稱取樣本並於下列條件下測定。

裝置：METTLER TOLEDO DSC 822e

測定溫度範圍：30°C -300°C

加熱速率：10°C/min

大氣壓：N<sub>2</sub> 40 mL/min

一般而言，微差掃描熱量法(DSC)可涉及± 2°C範圍內的誤差。於是，微差掃描熱量法測量時之特定值應該包含± 2°C範圍內的任何數值。

實施例中各術語之意義如下。

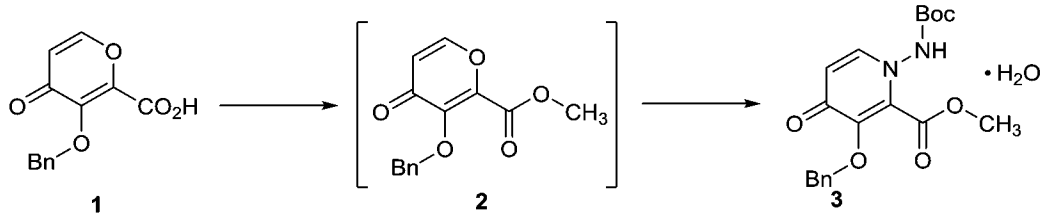
DMA：N,N-二甲基乙醯胺

THF：四氫呋喃

T3P：丙基磷酸酐(環狀三聚體)

【0041】實施例1：化合物3之製備

[化學式23]



步驟1：化合物3

將DMA(300 mL)添加至化合物1(100.00 g，406 mmol)以及攪拌混合物。添加碳酸氫鈉(44.41 g，529 mmol)、硫酸二甲酯(58.91 g，467 mmol)及DMA(100 mL)且於25°C下攪拌7小時。添加合成的鹽酸(16.90 g)及水(500 g)至反應混合物，以及用乙酸乙酯(1000及550 mL)來萃取混合物二次。有機層係用5%鹽水(300 g)及水(300 g)予以清洗。合併之有機層係於減壓下濃縮至約500 g。將乙酸乙酯(350 mL)添加至濃縮物，以及形成的溶液係於減



壓下濃縮至約500 g。添加DMA(300 mL)至濃縮物，以及形成的溶液係於減壓下濃縮至約400 g。將對甲苯磺酸吡啶鎘 (Pyridinium p-toluenesulfonate) (265.42 g) 及DMA(100 mL)添加至濃縮物以及使反應混合物加熱至60 °C。於6小時期間緩慢地添加配於DMA(100 mL)之胍基甲酸叔丁酯(tert-butyl carbazinate)(69.80 g, 528 mmol)溶液至反應混合物。於60 °C下攪拌反應混合物3小時且冷卻至25 °C。添加乙醇(100 mL)及水(290 mL)至反應混合物，以及使反應混合物溫熱至30 °C。緩慢地添加乙醇(100 mL)及水(520 mL)之混合物至反應混合物。使反應混合物冷卻至0 °C然後於0 °C下攪拌1.5小時。形成的淡黃白色沈澱物係用過濾來收集。形成的固體係用乙醇(480 mL)及水(720 mL)的混合物來清洗，且予以乾燥以提供如淡黃白色固體之化合物3的單水合物(122.70 g, 產量77%)。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.45 (s, 9H), 3.77 (s, 3H), 5.26 (s, 2H), 6.39 (d,  $J = 7.6\text{Hz}$ , 1H), 7.27-7.47 (m, 6H), 7.64-8.23 (br s, 1H)

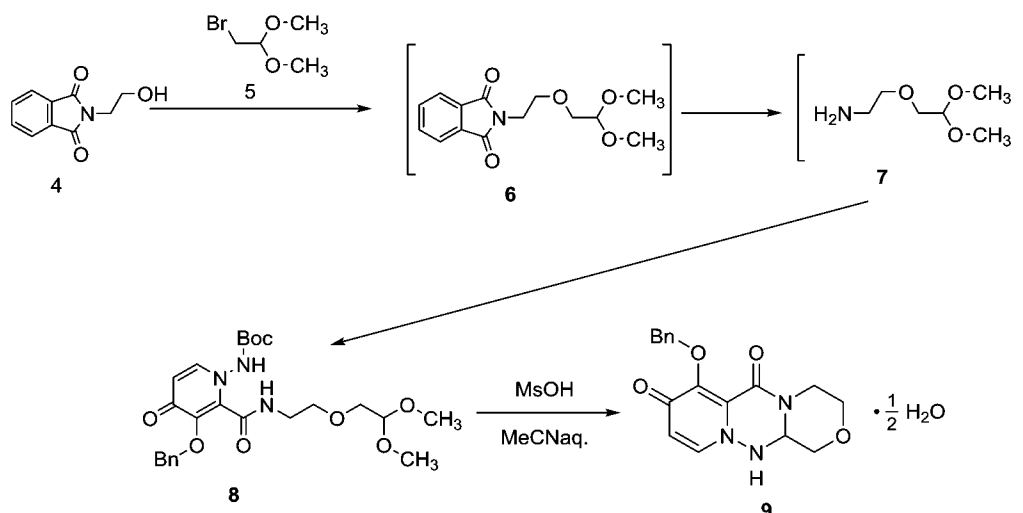
粉末X射線繞射 $2\theta$  (°): 5.4、7.5、8.4、10.6、11.9、13.5、20.2、22.9

圖1顯示化合物3之粉末X射線繞射圖型。

根據卡耳費雪法之水含量: 4.5%

**【0042】** 實施例2: 化合物9之製備

[化學式24]



### 步驟1：化合物6

將化合物5(28.29 g, 167.4 mmol)及DMA(65 mL)添加至化合物4(20.00 g, 104.6 mmol), 以及攪拌混合物。使混合物溫熱至40°C後, 緩慢地添加第三丁氧基鈉(15.09 g, 157.0 mmol)。於40°C下攪拌反應混合物3小時然後冷卻至20°C。添加乙酸(3.14 g)及10%氯化鈉水溶液(64 g)至反應混合物, 以及用乙酸乙酯來萃取混合物二次(60 mL)。添加水(144 mL)至合併的有機層以及使混合物冷卻至0°C。形成的淡黃白色沈澱物係用過濾來收集。形成的固體係用甲醇(5.4 g)及水(48.6 g)的混合物來清洗, 且予以乾燥以提供如淡黃白色固體之化合物6(20.44 g, 產量78%)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.34 (s, 6H), 3.53 (d,  $J = 5.2\text{Hz}$ , 2H), 3.76 (t,  $J = 5.6\text{Hz}$ , 2H), 3.90 (t,  $J = 5.6\text{ Hz}$ , 2 H), 4.43 (t,  $J = 5.2\text{ Hz}$ , 1 H), 7.70 - 7.73 (m, 2 H), 7.84 - 7.87 (m, 2 H)

### 【0043】步驟2 化合物8

添加乙醇(20 mL)及水(20 mL)至化合物6(20.02 g, 71.68 mmol), 以及攪拌混合物。使混合物溫熱至60°C。添加60%胼的單水合物水溶液(8.99 g, 107.7 mmol)至混合物且於60°C下攪拌4小時。添加水(40 mL)之後接著冷卻至30°C, 添加17%氫氧化鉀水溶液(92.12 g)至反應混合物。用二氯甲烷來萃取反應混合物四次(120, 78, 78, 78 mL)。合併的有機層係用水(20 mL)予以清洗, 以及於減壓下濃縮至約160 g。添加THF(100 mL)至濃縮物, 以及混合物係於減壓下濃縮至約40 g。添加THF(100 mL)至濃縮物, 以及混合物係於減壓下濃縮至約40 g。添加THF(20 mL)至濃縮物, 以及混合物係於減壓下濃縮至約15 g以獲得15 g配於THF的化合物7溶液。

將以上的化合物7THF溶液(14.71 g)、THF(7 g)及1,8-二氮雜二環[5.4.0]-7-十一烯(1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene)(379.0 mg)添加至化合物3(10.00 g, 25.5 mmol), 以及攪拌混合物。使反應混合物加熱至60°C然後於60°C下攪拌24小時。反應混合物冷卻至25°C後, 添加水(28 g)及乙酸(3.72 g)。用乙酸乙酯來萃取反應混合物二次(50, 30 mL), 以及有機層係用5%碳酸氫鈉水溶液(30 g)及水(28 g)予以清洗。有機層係於減壓下濃縮至約36 g。將乙酸乙酯添加至反應混合物, 以及形成的混合物係於減壓下濃縮至約36 g。添加庚烷(65 mL)至濃縮物以及使混合物冷卻至5°C。於5°C下攪拌1小時後, 形成的淡黃白色沈澱物係用過濾來收集。形

成的固體係用庚烷(32 mL)及乙酸乙酯(14 mL)的混合物來清洗，且予以乾燥以獲得如淡黃白色固體之化合物8(10.10 g，產量81%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 1.44 (s, 9H), 3.32-3.48 (m, 12H), 4.41 (t,  $J = 5.2\text{Hz}$ , 1H), 5.29 (s, 2H), 6.38 (d,  $J = 7.6\text{Hz}$ , 1H), 7.11-7.50 (m, 7H), 8.46 (s, 1H)。

### 【0044】步驟3：化合物9

將乙腈(170 mL)及水(30 mL)添加至化合物8(19.99 g，40.7 mmol)，以及攪拌混合物。使反應混合物加熱至60°C，以及緩慢地添加甲磺酸(11.70 g，121.7 mmol)。反應混合物於60°C下攪拌6小時然後冷卻至25°C。添加30%氫氧化鈉水溶液(15.91 g)至反應混合物，以及形成的混合物係於減壓下濃縮至約100 g。添加水(50 mL)至濃縮物，以及形成的混合物係於減壓下濃縮至約100 g。於25°C下攪拌30分鐘後，形成的黃色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用水(40 mL)來清洗且予以乾燥以得到如黃色結晶之化合物9的0.5水合物(10.43 g，產量76%)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 2.95 (ddd,  $J = 13.7, 12.3, 4.3\text{ Hz}$ , 1H), 3.13 (dd,  $J = 11.2, 10.0\text{ Hz}$ , 1H), 3.44 (td,  $J = 11.9, 3.1\text{ Hz}$ , 1H), 3.96-4.08 (m, 2H), 4.14 (dd,  $J = 13.9, 2.4\text{ Hz}$ , 1H), 4.80 (ddd,  $J = 12.6, 9.9, 4.5\text{ Hz}$ , 1H), 5.08 (s, 2H), 6.22 (d,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , 1H), 7.24-7.41 (m, 4H), 7.52-7.60 (m, 2H), 7.69 (d,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , 1H)

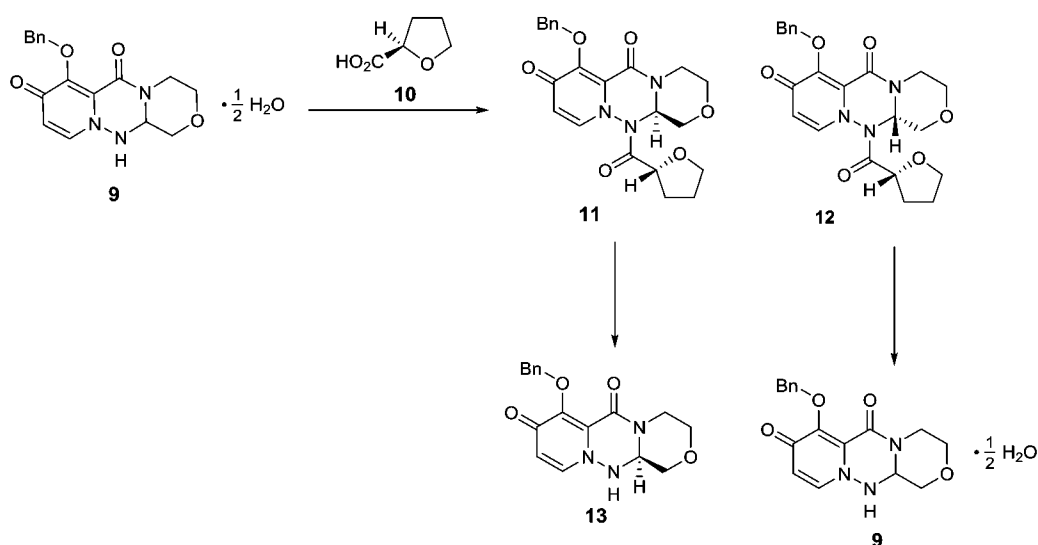
粉末X射線繞射 $2\theta$  ( $^{\circ}$ ): 9.5、13.4、18.0、19.3、21.2、22.5、22.8、23.6、27.5、28.1

圖2顯示化合物9之粉末X射線繞射圖型。

根據卡耳費雪法之水含量：2.8%

【0045】實施例3：化合物13之方法

[化學式25]



步驟1：化合物11及12

添加乙酸乙酯(87 mL)及50(w/w)% T3P乙酸乙酯溶液(145.80 g, 229.1 mmol)至化合物9的0.5水合物(30.00 g, 89.2 mmol)，以及攪拌混合物。使反應混合物加熱至 $60^{\circ}\text{C}$ ，添加三乙胺(18.55 g, 183.3 mmol)，然後緩慢地添加(R)-(+)-四氫呋喃-2-羧酸(12.24 g, 105.4 mmol)。於 $60^{\circ}\text{C}$ 下攪拌反應混合物4.5小時然後冷卻至 $0^{\circ}\text{C}$ ，以及形成的淡黃色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用乙酸乙酯(120 mL)來清洗以得到如淡黃色固體之化合物11(18.34 g, 未乾燥)。並且，合併濾液及清洗溶液以得到

化合物12之乙酸乙酯溶液(358.60 g)。

**【0046】** 步驟2：化合物13及9

將乙酸乙酯(120 mL)及1,8-二氮雜二環[5.4.0]-7-十一烯(530 mg, 3.5 mmol)添加至化合物11(15.28 g)，以及攪拌混合物。使反應混合物加熱至30℃，以及緩慢地添加甲醇(1.67 g)及乙酸乙酯(43 mL)之混合物。使反應混合物於室溫下攪拌1小時，以及形成的白色沈澱物係用過濾來收集。得到的結晶係用乙酸乙酯(60 mL)來清洗且乾燥以得到化合物13的白色結晶(11.06 g，產量45%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 2.84-2.92 (m, 2H), 3.45 (td,  $J = 3.2\text{Hz}, 12.0\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 3.82 (dd,  $J = 4.0\text{Hz}, 11.2\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 3.92 (dd,  $J = 4.4\text{Hz}, 11.6\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 4.13 (dd,  $J = 2.8\text{Hz}, 13.6\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 4.47-4.54 (m, 1H), 4.96 (d,  $J = 9.6\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 5.27 (d,  $J = 10.0\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 5.76 (d,  $J = 13.2\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 6.19 (d,  $J = 7.6\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 7.22 (d,  $J = 8.0\text{Hz}, 1\text{H}$ ), 7.30-7.38 (m, 3H), 7.59 (dd,  $J = 1.6\text{Hz}, 8.0\text{Hz}, 2\text{H}$ )。

粉末X射線繞射 $2\theta$  (°): 7.1、14.1、15.1、21.0、21.2、22.9、23.4

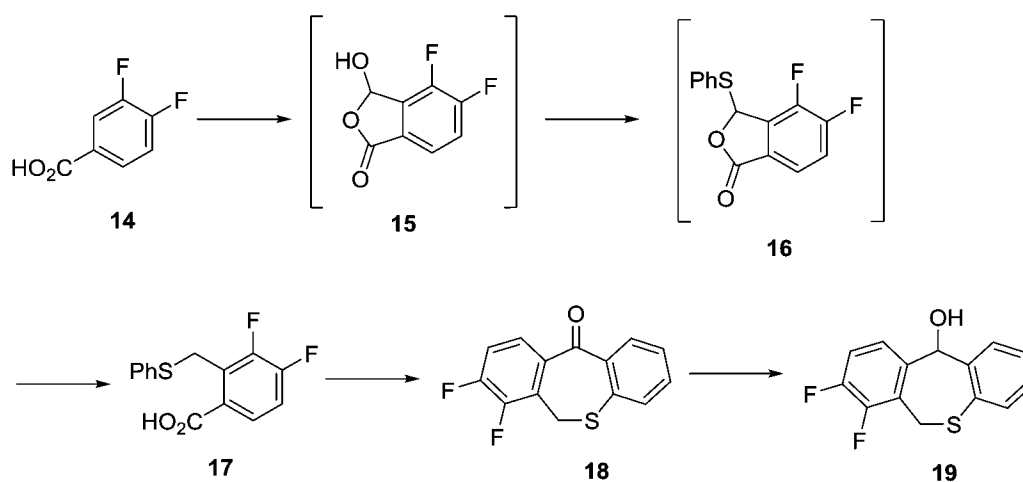
圖3顯示化合物13之粉末X射線繞射圖型。

**【0047】** 配於乙酸乙酯之化合物12溶液(334.69 g)係於減壓下濃縮至約170 g。濃縮溶液係於25℃下攪拌。緩慢地添加乙腈(224 mL)、水(56 mL)及24%氫氧化鈉水溶液(150 g)至混合物，然後分離成有機層及水層。添加水(14 mL)至水層以及用乙腈來萃取二次(168 mL)。合併的有機

層係於減壓下濃縮至約250 g。將濃縮物加熱至60°C，以及添加1,8-二氮雜二環[5.4.0]-7-十一烯(19.01 g，124.9 mmol)。於60°C下攪拌反應混合物3.5小時然後冷卻至40°C。添加5.8%含水鹽酸(50.40 g)至反應混合物，以及使形成的混合物冷卻至25°C以得到一溶液(314.96 g)。溶液的一部分(158.86 g)係於減壓下濃縮至約85 g。使濃縮物於20°C下攪拌2小時，並添加水(28 mL)。反應混合物係於減壓下濃縮至約100 g。於20°C下攪拌濃縮物1小時後，沈澱的淡黃白色結晶係用過濾來收集。得到的結晶係用水(42 mL)來清洗且予以乾燥以得到如淡黃白色結晶之化合物9(5.93 g，產量42%)。

【0048】 實施例4：化合物19

[化學式26]



步驟1：化合物15

將二異丙胺(7.69 g，76.0 mmol)添加至THF(25 mL)，以及攪拌混合物且冷卻至-40°C。添加1.6 mol/L正丁基鋰(43.5 mL，69.6 mmol)後，形成的混合物於0°C下

攪拌1小時。使混合物冷卻至 $-40^{\circ}\text{C}$ ，以及緩慢地添加配於THF(25 mL)之3,4-二氟苯甲酸(5.00 g, 31.6 mmol)溶液。反應混合物於 $-40^{\circ}\text{C}$ 下攪拌1小時，以及緩慢地添加N,N-二甲基甲醯胺(5.74 g, 78.5 mmol)。添加6 mol/L含水鹽酸(34.25 mL)至反應混合物，以及使混合物溫熱至 $25^{\circ}\text{C}$ 且分離成有機層及水層。用乙酸乙酯(15 mL)來萃取水層。合併的有機層係用水(5 mL)予以清洗。於減壓下濃縮後，添加甲苯至殘餘物以得到化合物15的甲苯溶液。

**【0049】 步驟2：化合物16**

將甲苯(17.8 mL)、硫酚(3.90 g, 35.4 mmol)及D-樟腦磺酸(1.16 g, 5.0 mmol)添加至以上的化合物15溶液。攪拌混合物且加熱至 $60^{\circ}\text{C}$ 。於 $60^{\circ}\text{C}$ 下攪拌反應混合物4小時然後冷卻至 $5^{\circ}\text{C}$ 。添加2 mol/L氫氧化鈉溶液(10 mL)至反應混合物，以及形成的混合物溫熱至 $25^{\circ}\text{C}$ 。用甲苯(10 mL)來萃取反應混合物，以及有機層係用2 mol/L氫氧化鈉(5 mL)及水(10 mL)予以清洗。有機層於減壓下濃縮後，添加甲苯以得到化合物16的甲苯溶液。

**【0050】 步驟3：化合物17**

使氯化鋁(5.52 g, 41.4 mmol)及甲苯(25 mL)之混合物攪拌且冷卻至 $0^{\circ}\text{C}$ 。配於甲苯(10 mL)之1,1,3,3-四甲基二矽氧(5.56 g, 41.4 mmol)溶液逐滴地添加至反應混合物，以及使反應混合物溫熱至 $25^{\circ}\text{C}$ 。將以上的化合物16之甲苯溶液緩慢地添加至反應混合物，以及混合物於 $25^{\circ}\text{C}$ 下攪拌2.5小時。添加15%硫酸水溶液(35 mL)之後，攪拌混



合物然後分離成有機層及水層。用水(20 mL)來清洗有機層二次。溶液於減壓下濃縮至約16 g。緩慢地添加庚烷(40 mL)至濃縮物以及冷卻至0°C。形成的白色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用庚烷(20 mL)來清洗然後予以乾燥以得到如白色固體之化合物17(7.20 g, 產量81.3%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ :4.61 (d,  $J = 1.6\text{Hz}$ , 2H), 7.09-7.15 (m, 1H), 7.23-7.27 (m, 3H), 7.34-7.37 (m, 2H), 7.84-7.88 (m, 1H)

#### 【0051】步驟4：化合物18

攪拌多磷酸(425.0 g)且加熱至80°C。添加化合物17(85.0 g)，以及使混合物溫熱至120°C且於120°C下攪拌3小時。使反應混合物冷卻至80°C，以及緩慢地添加水(200 mL)。使反應混合物冷卻至30°C，以及添加水(850 mL)。用乙酸乙酯(850 mL)來萃取混合物。有機層係用水(425 mL)及10%碳酸氫鈉水溶液(255 mL)予以清洗。於減壓下蒸發溶劑，以及添加庚烷(340 mL)至得到的殘餘物。於減壓下蒸發溶劑，以及添加庚烷(85 mL)至得到的殘餘物。於30°C下攪拌反應混合物30分鐘後，形成的棕色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用庚烷(42 mL)來清洗然後予以乾燥以得到如棕色固體之化合物18(72.0 g, 產量91%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ :4.14 (d,  $J = 1.0\text{Hz}$ , 2H), 7.09-7.18 (m, 1H), 7.27-7.33 (m, 1H), 7.34-7.45 (m, 3H), 8.19 (dd,  $J = 8.5\text{Hz}$ , 1.4Hz, 1H)

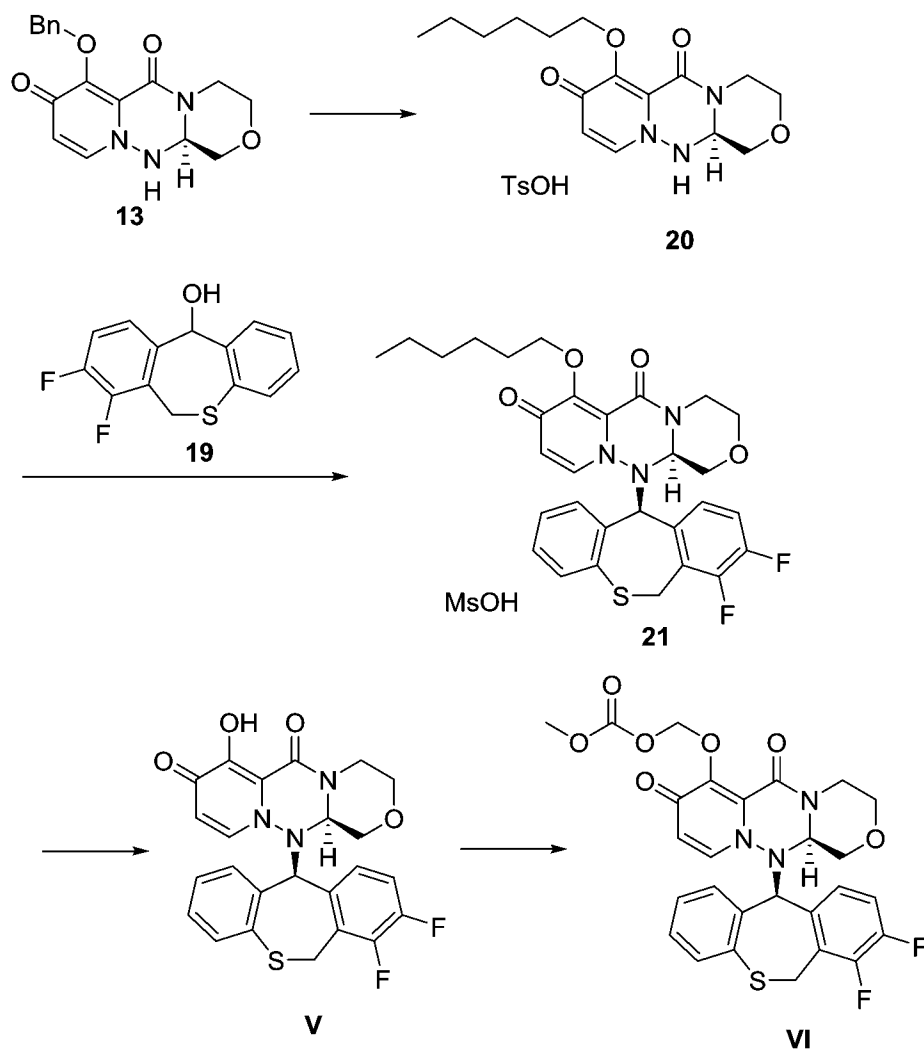
**【0052】 步驟5：化合物19**

使硼氫化鈉(234.0 mg, 6.2 mmol)懸浮於0.5%氫氧化鈉水溶液(1.8 mL)內以製備硼氫化鈉懸浮液。添加2-丙醇(20 mL)及水(2.25 mL)至化合物18(4.5 g, 17.2 mmol)。攪拌混合物且加熱至40°C。以上的硼氫化鈉懸浮液緩慢地添加至混合物。於40°C下攪拌反應混合物1.5小時且冷卻至25°C。將水(32 mL)添加至反應混合物，接著添加水(6.7 mL)及62%硫酸水溶液(460 mg)之混合溶液。使反應混合物冷卻至5°C，以及形成的棕色沈澱物係用過濾來收集。固體係用水(18 mL)來清洗然後予以乾燥以得到如棕色固體之化合物19(4.4 g, 產量97%)。

<sup>1</sup>H-NMR(CDC13) δ: 2.67 (d, J = 3.8Hz, 1H), 4.20 (dd, J = 14.4, 1.4Hz, 2H), 4.68 (dd, J = 14.5, 1.3Hz, 2H), 7.02 (dt, J = 9.7, 8.3Hz, 1H), 7.12-7.21 (m, 4H), 7.44-7.49 (m, 1H)

**【0053】 實施例5：化合物(V)及(VI)**

[化學式27]



### 步驟1-1：化合物20

合併1-己醇(22.5 g, 220 mmol)及THF(24.6 g)，以及調整混合物的溫度至20℃。將配於THF之異丙基氯化鎂溶液(2 mol/L, 7.2 g, 14.7 mmol)添加至混合物以製備六氧化鎂(magnesium hexoxide)溶液。

將1-己醇(22.5 g, 220 mmol)添加至化合物13(12.0 g, 36.7 mmol)伴隨攪拌，以及調整混合物的溫度至20℃。將以上的六氧化鎂溶液添加至形成的化合物13漿體。使反應混合物於20℃下攪拌4小時，然後添加檸檬酸水溶液(3.1 g的檸檬酸單水合物及36 g的水)。用THF(10.7 g)來萃取

混合物，以及有機層係用水(24 g)予以清洗。有機層係於減壓下濃縮至約55 g。將配於THF的對甲苯磺酸溶液(7.0 g的對甲苯磺酸單水合物及42.8 g的THF)添加至形成的濃縮物。混合物係於減壓下濃縮至約61 g。添加THF(42.7 g)至濃縮物，以及形成的混合物係於減壓下濃縮至約61 g。於加熱混合物至50°C後，添加甲基三級丁基醚(133.0 g)。形成的混合物冷卻至10°C，以及於10°C下攪拌1.5小時。形成的白色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用甲基三級丁基醚(40.0 g)及乙酸乙酯(16.0 g)之混合物來清洗，且予以乾燥以得到如白色結晶之化合物20的甲苯磺酸鹽(15.8 g，產量87.2%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 0.88 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.25-1.34 (m, 4H), 1.34-1.43 (m, 2H), 1.76-1.85 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 3.04 (ddd,  $J = 13.6, 11.7, 4.3$  Hz, 3H), 3.36 (dd,  $J = 11.6, 10.0$  Hz, 3H), 3.43 (ddd,  $J = 13.6, 12.0, 4.4$  Hz, 3H), 4.00 (dd,  $J = 11.7, 4.3$  Hz, 1H), 4.06-4.18 (m, 4H), 4.80 (br, s, 1H), 7.16 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.62 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.62 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 8.17 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 8.40 (br, s, 1H)。

粉末X射線繞射 $2\theta(^{\circ})$ : 5.9、8.4、11.6、12.7、13.1、15.7

圖4顯示化合物20之粉末X射線繞射圖型。

#### 【0054】步驟1-2：化合物20

使用配於THF之環己基氯化鎂溶液(16.2 wt%，0.4 eq)

代替配於THF之異丙基氯化鎂溶液(0.4 eq)，以步驟1-1中描述的方式來進行反應，以及藉由HPLC來分析反應混合物以判定化合物20之生成率。

化合物20之HPLC面積百分比：90.9%(RT = 11.0 min)

其他程序與步驟1-1中所述相同。

(測量條件)

(1)管柱：X Select™ CSH C18 (3.5 μm內徑 4.6 × 100 mm) (Waters)

流速：1.0 mL/min；UV檢測波長：254 nm；

流動相：

[A]0.1%甲酸水溶液，[B]乙腈

梯度程式：([B]的濃度) 15%-15% 5min；15%-60% 10 min；60%-85% 2 min；85%-85% 3min。

【0055】步驟1-3：化合物20

將1-己醇(27.5 g，270 mmol)添加至化合物13(4.91 g，15.0 mmol)，以及攪拌混合物。調整混合物的溫度至0℃。將配於THF之叔戊氧基鈉溶液(1.4 mol/L，45.0 mmol)添加至形成的漿體。於0℃攪拌2.5小時之後，藉由HPLC來分析反應混合物以判定化合物20之生成率。

化合物20之HPLC面積百分比：93.3% (RT = 9.5 min)

(測量條件)

(1)管柱：CHIRALPAK™ IB(5.0 μm內徑 4.6 × 250 mm) (DAICEL)

流速：1.0 mL/min；UV檢測波長：254 nm；

流動相：

[A] 0.1% 甲酸，[B] 乙腈

梯度程式：([B]的濃度) 35%-35% 5min；35%-85% 6 min；85%-85% 2min。

如以上所示，發現當使用鎂鹽或鈉鹽時，反應以產量良好的方式進行。獲得高產量所欲的產物，尤其是使用異丙基氯化鎂時。

#### 【0056】步驟2：化合物21之甲磺酸鹽

將化合物19(8.0 g, 30.3 mmol)、乙酸乙酯(48.7 g)及環己烷(14.1 g)添加至化合物20(12.0 g, 24.3 mmol)，以及混合物於25°C下攪拌。添加50 (w/w)% T3P乙酸乙酯溶液(20.91 g, 32.9 mmol)，接著添加甲磺酸(3.5 g, 36.4 mmol)。使混合物加熱至60°C且攪拌24小時。冷卻至25°C後，添加THF(32.0 g)及水(24.0 g)，然後緩慢地添加24%氫氧化鈉水溶液(30.8 g)。於澄清之後，使混合物分離成有機層及水層。用7%氯化鈉水溶液(60.0 g)來清洗有機層二次。將配於環己烷(9.3 g)之甲磺酸溶液(2.80 g, 29.1 mmol)及乙酸乙酯(32.1 g)添加至合併的有機層。混合物於25°C下攪拌2小時，以及形成的白色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用乙酸乙酯(43.3 g)來清洗然後予以乾燥以得到如白色結晶之化合物21的甲磺酸鹽(13.65 g, 產量84.6%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.90 (3H, t,  $J = 6.0$  Hz),

1.29-1.36 (4H, m), 1.39-1.49 (2H, m), 1.67-1.79 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.94 (1H, br s), 3.30 (1H, td,  $J = 11.6, 2.4$  Hz), 3.51 (1H, t,  $J = 10.4$  Hz), 3.66 (1H, dd,  $J = 11.2, 2.8$  Hz), 3.92-4.01 (2H, m), 4.07 (1H, d,  $J = 14.3$  Hz), 4.20 (1H, s), 4.42-4.52 (1H, m), 5.43 (1H, dd,  $J = 14.4, 2.1$  Hz), 5.79-5.83 (2H, m), 6.81 (1H, td,  $J = 7.6, 1.2$  Hz), 6.96 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.0$  Hz), 7.09 (1H,  $J = 8.0, 1.6$  Hz), 7.12-7.18 (1H, m), 7.32 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz), 7.37-7.49 (2H, m)

粉末X射線繞射 $2\theta$  ( $^{\circ}$ ) : 7.1、9.3、12.6、14.1、17.7、18.7、19.2、22.2、25.4、27.7、28.5、37.8

圖5顯示化合物21之粉末X射線繞射圖型。

DSC : 開始 $216^{\circ}\text{C}$  , 尖峰 $219^{\circ}\text{C}$  。

**【0057】** 步驟3 : 化合物(V)

添加氯化鋰(8.6 g , 203.3 mmol)至N-甲基吡咯啉酮(52.4 g)及化合物21(15.0 g , 22.6 mmol)的混合物 , 以及形成的混合物加熱至 $75^{\circ}\text{C}$ 。混合物於 $75^{\circ}\text{C}$ 下攪拌20小時然後冷卻至 $40^{\circ}\text{C}$ 。添加乙腈(20.0 g)至反應混合物 , 接著添加水(11.6 g)。冷卻混合物至 $30^{\circ}\text{C}$ 且攪拌30分鐘後 , 緩慢地添加水(142.5 g)。於 $30^{\circ}\text{C}$ 攪拌1.5小時後 , 形成的白色沈澱物係用過濾來收集。得到的固體係用2-丙醇(60.1 g)來清洗然後予以乾燥以得到如白色結晶之化合物(V)(9.91 g , 產量90.7%)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.00 (td,  $J = 11.8, 3.2$  Hz, 1H),

3.46 (td,  $J = 12.0, 2.8$  Hz, 1H), 3.59 (t,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 3.82 (dd,  $J = 12.2, 3.0$  Hz, 1H), 3.96 (dd,  $J = 11.0, 3.0$  Hz, 1H), 4.07 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H), 4.58 (dd,  $J = 10.0, 2.8$  Hz, 1H), 4.67 (dd,  $J = 13.6, 2.0$  Hz, 1H), 5.26-5.30 (m, 2H), 5.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.69 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.83-6.87 (m, 1H), 6.99-7.04 (m, 2H), 7.07-7.15 (m, 3H)。

粉末X射線繞射 $2\theta$  ( $^{\circ}$ ): 9.6、10.9、17.8、21.5、22.1、23.5、24.8

圖6顯示化合物(V)之粉末X射線繞射圖型。

#### 【0058】步驟4：化合物(VI)

氯甲基碳酸二甲酯(0.483 g, 3.10 mmol)、碳酸鉀(0.572 g, 4.14 mmol)及碘化鉀(0.343 g, 2.07 mmol)係與配於DMA(5 ml)之化合物(V)(1.00 g, 2.07 mmol)懸浮液混合。使混合物加熱至 $50^{\circ}\text{C}$ 且攪拌6小時。添加DMA(1 ml)至反應混合物，以及形成的混合物攪拌6小時。使反應混合物冷卻至室溫，以及添加DMA(6 ml)。使混合物於 $50^{\circ}\text{C}$ 下攪拌5分鐘然後過濾。於冰冷卻下逐滴地添加1 mol/L鹽酸(10 ml)及水(4 ml)至得到的濾液，然後，使混合物攪拌1小時。沈澱的固體係用過濾來收集以及於 $60^{\circ}\text{C}$ 減壓下乾燥3小時以得到化合物(VI) (1.10 g, 1.93 mmol, 產量93%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$ : 2.91-2.98 (1H, m), 3.24-3.31 (1H, m), 3.44 (1H, t,  $J = 10.4$  Hz), 3.69 (1H,

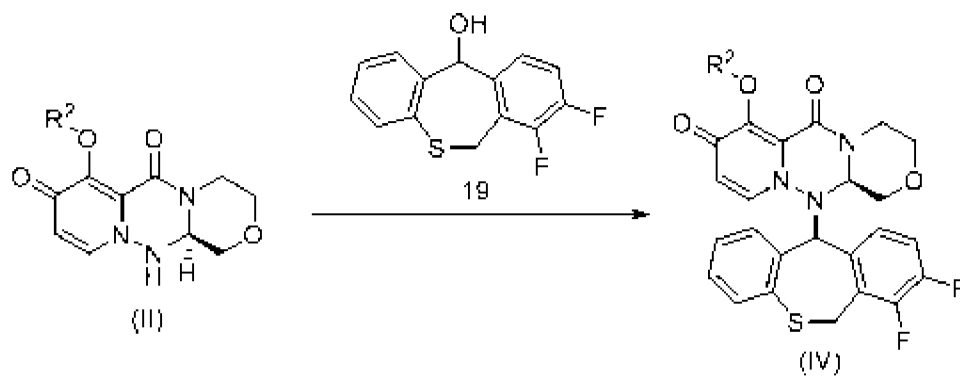


dd,  $J = 11.5, 2.8$  Hz), 3.73 (3H, s), 4.00 (1H, dd,  $J = 10.8, 2.9$  Hz), 4.06 (1H, d,  $J = 14.3$  Hz), 4.40 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz), 4.45 (1H, dd,  $J = 9.9, 2.9$  Hz), 5.42 (1H, dd,  $J = 14.4, 1.8$  Hz), 5.67 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 5.72-5.75 (3H, m), 6.83-6.87 (1H, m), 7.01 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz), 7.09 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.1$  Hz), 7.14-7.18 (1H, m), 7.23 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 7.37-7.44 (2H, m)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$ : 2.91-2.98 (1H, m), 3.24-3.31 (1H, m), 3.44 (1H, t,  $J = 10.4$  Hz), 3.69 (1H, dd,  $J = 11.5, 2.8$  Hz), 3.73 (3H, s), 4.00 (1H, dd,  $J = 10.8, 2.9$  Hz), 4.06 (1H, d,  $J = 14.3$  Hz), 4.40 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz), 4.45 (1H, dd,  $J = 9.9, 2.9$  Hz), 5.42 (1H, dd,  $J = 14.4, 1.8$  Hz), 5.67 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz), 5.72-5.75 (3H, m), 6.83-6.87 (1H, m), 7.01 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz), 7.09 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.1$  Hz), 7.14-7.18 (1H, m), 7.23 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 7.37-7.44 (2H, m)。

**【0059】** 實施例6：化合物33至41之製備及其等之非鏡相異構物比例(diastereomeric ratio)

[化學式28]



化合物 (II)	化合物 (IV)	R <sup>2</sup>	產量 %	非鏡相異構物比例 a:b
24	33		-	3 : 1
25	34		50	6 : 1
26	35		-	3 : 1
27	36		87	3.8 : 1
28	21		89	15.5 : 1
28	37		24	2.3 : 1
29	38		-	1.9 : 1
30	39		-	3.1 : 1
31	40		63	4.9 : 1
32	41		89	6.3 : 1

步驟1：化合物24至32

化合物24至32係依據實施例5之步驟1-1、1-2及1-3，以及慣用方法予以製備。

【0060】步驟2：化合物33至41

化合物24至32之各者係用實施例5中所述之步驟2的程序而與化合物19反應，以及藉由HPLC來分析反應混合物以判定化合物33至41之非鏡相異構物比例。

化合物33a : tR 6.4 min/化合物33b : tR 6.7 min  
化合物34a : tR 8.9 min/化合物34b : tR 9.3 min  
化合物35a : tR 9.8 min/化合物35b : tR 10.1 min  
化合物36a : tR 10.7 min/化合物36b : tR 11.1 min  
化合物37a : tR 12.5 min/化合物37b : tR 12.8 min  
化合物38a : tR 13.4 min/化合物38b : tR 13.8 min  
化合物39a : tR 8.7 min/化合物39b : tR 9.0 min  
化合物40a : tR 9.9 min/化合物40b : tR 10.2 min  
化合物41a : tR 10.6 min/化合物41b : tR 11.0 min  
(tR : HPLC測定之滯留時間)

(測量條件)

管柱 : KINETEX™ (2.6 μm C18內徑 4.6 × 100 mm)

(Shimadzu)

流速 : 1.0 mL/min ; UV檢測波長 : 254 nm ;

流動相 : [A] 0.1%甲酸水溶液 , [B] 0.1%甲酸配於乙腈

梯度程式 : ([B]的濃度) 25%-70% 10 min ; 70%-70% 8 min 。

**【0061】** 測試實施例1 : 帽依賴性核酸內切酶(CEN) 抑制活性之測定

1) 基質之製備

購入5'端之G已經以二磷酸化修飾, 2'位置之羥基已經以甲氧基化修飾, 自5'端第6個位置之U已經以Cy3標識, 且 3' 端 已 經 以 BHQ2 標 識 的

30merRNA(5'-pp-[m2'-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA-BHQ2-3' , Japan Bioservice) , 以及使用EPICENTRE製造之ScriptCap系統來加成帽結構以提供產物 m7G [5']-ppp-[5'] [m2'-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA(-BHQ2)-3')。產物係藉由變性聚丙烯醯胺膠體電泳法予以分離及純化，以及使用作為基質。

## 2) 酵素之製備

RNP係依據標準方法由病毒顆粒製備而成(參考文獻：VIROLOGY (1976) 73, p327-338 OLGA M. ROCHOVANSKY)。具體而言，將A/WSN/33病毒( $1 \times 10^3$  PFU/mL, 200 $\mu$ L)接種至10天大之含胚雞蛋。於37°C下孵育2天後，回收雞蛋之尿囊液。藉由使用20%蔗糖之超離心而對病毒顆粒進行純化後，使用TritonX-100與溶血卵磷脂而予以溶化，以及藉由使用30-70%甘油密度梯度之超離心而採集RNP餾分(50~70%甘油餾分)，且用作為酵素溶液(包含約1nM之PB1/PB2/PA複合體)。

## 3) 酵素反應

將2.5  $\mu$ L 酵素反應溶液(53 mM Tris-鹽酸鹽(pH 7.8)、1mM MgCl<sub>2</sub>、1.25 mM二硫蘇糖醇、80mM NaCl、12.5%甘油、0.15  $\mu$ L 酵素溶液)分配至384孔聚丙烯平盤之內。繼而，添加經二甲基亞砷(DMSO)連續稀釋之測試化合物溶液0.5 $\mu$  L至平盤內。關於陽性對照(PC)及陰性對照(NC)，分別添加DMSO 0.5 $\mu$  L至平盤。充分混合溶液。

繼而，添加2 $\mu$  L受質溶液(1.4nM受質RNA，0.05% 妥文(Tween)20)以起始反應。於室溫下孵育60分鐘後，將反應液1 $\mu$  L添加至10 $\mu$  L之Hi-Di甲醯胺溶液(包含GeneScan 120 Liz Size Standard作為粒度分級標記物，Applied Biosystems(ABI)所製造)以使反應停止。關於NC，藉由於反應起始前添加EDTA(4.5 mM)而預先使反應停止(標註濃度為最終濃度)。

#### 4) 測量抑制率(IC<sub>50</sub>值)

如以上停止之反應溶液係於85 $^{\circ}$ C下加熱5分鐘，然後於冰上急冷2分鐘，以及用ABI PRIZM 3730遺傳分析儀(Genetic Analyzer)進行分析。藉由分析軟體ABI Genemapper來定量帽依賴性核酸內切酶產物之波峰。將PC及NC之螢光強度分別設為0%抑制及100%抑制，以判定測試化合物之CEN反應抑制率(%)，以及使用曲線擬合軟體(XLfit2.0：Model 205(IDBS))以判定IC<sub>50</sub>值。

#### 【0062】 測試實施例2：CPE抑制效果

##### <材料>

•2% FCS E-MEM(藉由添加康黴素(kanamycin)及FCS至MEM(最低必需培養基) (Invitrogen)來製備)

•0.5% BSA E-MEM(藉由添加康黴素及BSA至MEM(最低必需培養基) (Invitrogen)來製備)

•HBSS(漢克斯平衡鹽溶液(hanks' Balanced Salt Solution))

•MDBK細胞(用2% FCS E-MEM調整至適當細胞數(3

× 10<sup>5</sup>/mL))

•MDCK細胞(利用HBSS清洗2次後且用0.5% BSA E-MEM調整至適當細胞數(5 × 10<sup>5</sup>/mL)來製備)

•胰蛋白酶溶液(使來自豬胰之胰蛋白酶(SIGMA)溶解於PBS(-)中且通過0.45μm過濾器予以過濾)

•EnVision (PerkinElmer)

• WST-8套組(Kishida Chemical Co., Ltd.)

• 10% SDS溶液

### 【0063】<方法>

測試樣本之稀釋及分注

MDBK細胞使用2% FCS E-MEM作為培養培養基，以及MDCK細胞使用0.5% BSA E-MEM作為培養培養基。關於病毒、細胞及測試樣本之稀釋使用相同之培養培養基。

預先將測試樣本利用培養培養基稀釋為適度之濃度，以及於96孔平盤製作2至5倍連續稀釋系列(50 μL/孔)。分別製作2組平盤用於抗Flu活性測定用及細胞毒性測定。對各藥物實施三重測定。

當使用MDCK細胞來測定抗Flu活性時，將胰蛋白酶以成為最終濃度3ug/mL之方式添加於細胞中。

流行性感冒病毒之稀釋及分注

用培養培養基將流行性感冒病毒稀釋為適當之濃度且以50μL/孔分注至含有測試樣本的96孔平盤之內。將50μL/孔的培養溶液分注至測定細胞毒性用之平盤。

細胞之稀釋及分注

將細胞稀釋至適當之細胞數且以100 $\mu$ L/孔分注至含有測試樣本的96孔平盤之內。

細胞培養物係利用平盤混合器進行混合且於CO<sub>2</sub>培養箱中進行孵育。細胞培養3天用於抗Flu活性測定及細胞毒性測定。

#### WST-8之分注

用肉眼於顯微鏡下觀察培養了3天之96孔平盤以確認細胞之形態及有無結晶。以不吸取細胞之方式自平盤去除上清液。

WST-8套組係用培養培養基稀釋10倍，且將100  $\mu$ L的WST-8溶液分注至各孔內。利用平盤混合器進行混合後，細胞於CO<sub>2</sub>培養箱中培養1至3小時。

為了測量抗Flu活性，於平盤孵育後，將10% SDS溶液(10  $\mu$ L)分注至各孔以使病毒不活化。

#### 吸光度之測定

於96孔平盤混合過後，利用EnVision於450 nm/620 nm之2種波長下測定吸光度。

#### 【0064】<測定值之計算>

基於下列之方程式，使用Microsoft Excel或具有同等計算及處理能力之程式而算出數值。

計算達成50%流行性感冒感染細胞死亡抑制之有效濃度(EC<sub>50</sub>)

$$EC_{50} = 10^Z$$

$$Z = (50\% - \text{高}\%) / (\text{高}\% - \text{低}\%) \times \{\log(\text{高 conc.}) - \log(\text{低}\%) \}$$

conc.)) + log(高 conc.)

【0065】化合物(V)之測試實施例1及測試實施例2的結果顯示於以下。

測試實施例1(CEN IC 50)：1.93 nM，

測試實施例2(CPE EC 50)：1.13 nM

以上之結果揭示式(V)之化合物顯示出高的帽依賴性核酸內切酶(CEN)抑制活性及/或高的CPE抑制效果，故而，可作為由於感染流行性感冒病毒而誘發之症狀及/或疾病之治療及/或預防有用的藥物。

【0066】化合物(V)及(VI)的生物測試實施例說明如下。

【0067】測試實施例3：CYP抑制測試

使用市售之混合人類肝臟微粒體且使用人類主要五種CYP酵素形式(CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4)之典型受質代謝反應，即7-乙氧基試鹵靈O-脫乙基化(CYP1A2)、甲苯磺丁脲甲基-氫氧化(CYP2C9)、美芬妥英(mephenytoin)4'-氫氧化(CYP2C19)、右美沙芬(dextromethorphan)O-脫甲基化(CYP2D6)及特芬那定(terfenadine)氫氧化(CYP3A4)作為參考，對各代謝物生成被化合物(V)抑制之程度進行評價。

【0068】反應條件如下：

受質：0.5 μmol/L 乙氧基試鹵靈(CYP1A2)、100 μmol/L 甲苯磺丁脲(CYP2C9)、50 μmol/L S-美芬妥英(CYP2C19)、5 μmol/L 右美沙芬(CYP2D6)、1 μmol/L



特芬那定(CYP3A4)；反應時間：15分鐘；反應溫度：37℃；酵素：集合的人類肝臟微粒體0.2 mg蛋白質/mL；化合物(V)濃度：1、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  (4點)。

【0069】關於各5種受質，藉由添加上述比例之受質、人類肝臟微粒體及化合物(V)至50 mmol/L Hepes緩衝液中以製備反應溶液於96孔平盤中。添加一種輔因子，NADPH，以起始代謝反應。於37℃下孵育15分鐘後，添加甲醇/乙腈溶液(1/1(V/V))以使反應停止。以3000 rpm離心15分鐘後，利用螢光多標示計數儀來測定上清液中之試鹵靈(CYP1A2代謝物)，以及利用LC/MS/MS定量羥基甲苯磺丁脲(CYP2C9代謝物)、4'-羥基美芬妥英(CYP2C19代謝物)、右啡烷(dextrorphan)(CYP2D6代謝物)及特芬那定醇(CYP3A4代謝物)。

【0070】反應系統中僅添加DMSO(溶解化合物(V)之溶劑)者設為對照。計算該化合物於各濃度下，化合物(V)相對於對照(100%)之剩餘活性(%)，以及使用濃度與抑制率、藉由對數模式逆推定而算出 $\text{IC}_{50}$ 。

(結果)

化合物(V)：5種酵素形式 > 20  $\mu\text{mol/L}$

【0071】測試實施例4：BA測試

口服吸收性之研究材料與方法

(1)動物：小鼠或SD大鼠

(2)飼養條件：使小鼠或SD大鼠自由攝取固體飼料及滅菌自來水。

(3)劑量及編組：以預定劑量進行經口投與或靜脈內投與；以下述方式編組(劑量取決於化合物)

經口投與：1至30 mg/kg (n=2至3)

靜脈內投與：0.5至10 mg/kg (n=2至3)

(4)用劑溶液之製備：經口投與為溶液或懸浮液狀態；靜脈內投與為溶解狀態

(5)投與方法：經口投與係使用藉由口服探針強制性地投與至胃內；靜脈內投與係用附帶注射針之注射器自尾靜脈進行投與

(6)終點：經時採血，以及用LC/MS/MS來測定化合物(V)及(VI)之血漿濃度。

(7)統計分析：關於化合物(V)及(VI)之血漿濃度的轉變，係用非線性最小平方法程式WinNonlin™算出血漿濃度-時間曲線下面積(AUC)，以及從經口投與組與靜脈內投與組之AUC算出化合物(V)及(VI)之生體可用率(BA)。

(結果)

化合物(V)： 4.2%

化合物(VI)： 14.9%

以上之結果顯示出前驅藥之生物利用率較母化合物提高。

因此，式(VI)之化合物於口服吸收性方面很優異且可作為由於感染流行性感冒病毒而誘發之症狀及/或疾病之治療及/或預防有用的藥物。

**【0072】** 測試實施例5：代謝安定性測試

化合物(V)係與市售之混合人類肝臟微粒體反應一定時間。藉由比較反應樣本與未反應樣本而算出化合物剩餘率以評估化合物(V)於肝內代謝之程度。

**【0073】** 化合物係於含人類肝臟微粒體0.5mg蛋白質/mL的0.2mL之緩衝液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.4、150 mmol/L 氯化鉀、10 mmol/L 氯化鎂)中，於1 mmol/L NADPH存在下在37°C下反應0分鐘或30分鐘(氧化反應)。反應後，添加50 µL之反應溶液至100 µL之甲醇/乙腈=1/1(v/v)，混合且以3000 rpm離心15分鐘。以LC/Ms/Ms來測量上清液中化合物(V)的量，以及以反應時間0分鐘之化合物量作為100%，來計算反應後化合物之剩餘率。水解反應係於缺少NADPH之下進行，以及葡萄糖醛酸化反應係於5 mmol/L UDP-葡萄糖醛酸之存在下代替NADPH來進行，並且後續程序係以所述之相同方式進行。

(結果)

以下顯示2 µmol/L之化合物於氧化代謝中的剩餘率。

化合物(V)： 90.1%

**【0074】** 測試實施例6：CYP3A4螢光MBI測試

CYP3A4螢光MBI測試係探討化合物(V)於代謝反應之CYP3A4抑制之增強作用。藉由CYP3A4酵素(大腸桿菌內表現的酵素)而使7-苄氧基三氟甲基香豆素(7-BFC)予以脫苄基化並且生產出發出螢光的代謝物，7-羥基三氟甲基香豆素(7-HFC)。使用7-HFC生成反應為指標來執行該測試。

【0075】反應條件如下：

受質， $5.6 \mu\text{mol/L}$  7-BFC；預反應時間，0或30分鐘；反應時間，15分鐘；反應溫度， $25^\circ\text{C}$  (室溫)；CYP3A4含量(大腸桿菌內表現的)，預反應時為 $62.5 \text{ pmol/mL}$ ，反應時為 $6.25 \text{ pmol/mL}$ (10倍稀釋時)；化合物(V)之濃度， $0.625$ 、 $1.25$ 、 $2.5$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ (6點)。

【0076】將如上所述之含配於K-Pi緩衝液(pH 7.4)之酵素及化合物(V)的預反應溶液添加於96孔平盤上。將溶液之一部分移至另一96孔平盤上且以受質與K-Pi緩衝液1/10稀釋。添加作為輔因子之NADPH以起始反應(無預孵育)，以及於孵育預定時間後添加乙腈/ $0.5 \text{ mol/L Tris}$ (三羥基胺基甲烷)=4/1(V/V)以使反應停止。又，添加NADPH至另一預孵育溶液以起始預孵育(有預孵育)。於預孵育預定時間後，將溶液之一部分移至另一平盤上且以受質與K-Pi緩衝液1/10稀釋以起始反應。反應預定時間後，添加乙腈/ $0.5 \text{ mol/L Tris}$ (三羥基胺基甲烷)=4/1(V/V)以使反應停止。針對各進行過反應之平盤，藉由螢光平盤讀數儀來測定代謝物7-HFC之螢光值( $E_x=420 \text{ nm}$ ， $E_m=535 \text{ nm}$ )。

【0077】反應系統中僅添加DMSO(即，溶解化合物(V)之溶劑)者係作為剩餘活性之對照，以及計算溶液內各濃度之化合物(V)的剩餘活性(%)。使用濃度與抑制率、藉由對數模式逆推定而算出 $IC_{50}$ 。將 $IC_{50}$ 值之差異為 $5 \mu\text{M}$ 或以上之情形定義為(+)且將差異為 $3 \mu\text{M}$ 或以下之情形定義

為(-)。

(結果)

化合物(V)：(-)

**【0078】** 測試實施例7：變動安氏試驗(Fluctuation Ames test)

對化合物(V)之致突變性進行評價。

將冷凍保存之20  $\mu$ L鼠傷寒沙氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)(TA98株及TA100株)接種至10 mL液體營養培養基(2.5% Oxoid營養肉湯2號)中，以及培養物係於37°C下進行10小時振盪孵育。將TA98培養物(9mL)離心(2000  $\times$ g，10分鐘)而去除培養基，以及使細菌懸浮於9mL之Micro F緩衝液( $K_2HPO_4$ ：3.5 g/L、 $KH_2PO_4$ ：1 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ ：1 g/L、檸檬酸三鈉二水合物：0.25 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ：0.1 g/L)中。將懸浮液添加至110 mL之Exposure培養基(包含生物素：8  $\mu$ g/mL、組胺酸：0.2  $\mu$ g/mL、葡萄糖：8mg/mL之Micro F緩衝液)中。將TA100培養物(3.16 mL)添加至120mL之Exposure培養基中以製備試驗菌液。試驗菌液(588  $\mu$ L)，或者於代謝活化系統的情況下，試驗菌液(498  $\mu$ L)及S9混合物(90  $\mu$ L)之混合溶液，係與下列溶液各12  $\mu$ L進行混合：化合物(V)配於DMSO，自最高劑量50 mg/mL以數個步驟予以2或3倍連續稀釋；DMSO作為陰性對照；50  $\mu$ g/mL的4-硝基喹啉-1-氧化物配於DMSO作為沒有代謝活化系統之TA98的陽性對照；0.25  $\mu$ g/mL的2-(2-呋喃基)-3-(5-硝基-2-呋喃基)

丙烯醯胺配於DMSO作為沒有代謝活化系統之TA100的陽性對照；40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的2-胺基蒽配於DMSO作為有代謝活化系統之TA98的陽性對照；或20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的2-胺基蒽配於DMSO作為有代謝活化系統之TA100的陽性對照。混合物於37°C下進行90分鐘振盪孵育。將以此方式暴露於化合物(V)之菌液(460  $\mu\text{L}$ )添加至2300  $\mu\text{L}$ 的Indicator培養基(包含生物素：8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、組胺酸：0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、葡萄糖：8  $\text{mg}/\text{mL}$ 、溴甲酚紫：37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之Micro F緩衝液)，以及每50  $\mu\text{L}$ 的混合物分注至微量平盤內(每劑量48孔)。於37°C下靜置培養3天之後，包含藉由編碼胺基酸(組胺酸)合成酶的基因之突變而獲得增殖能力之細菌的孔，係由於pH值變化而自紫色變色為黃色。對每劑量48孔中黃色孔的數目進行計數以藉由與陰性對照組進行比較來評價致突變性。(-)表示致突變性為陰性且(+)表示陽性。

(結果)

化合物(V)： (-)

#### 【0079】 測試實施例8：hERG試驗

以評價心電圖QT間隔延長的危險性為目的，使用表現出人類ether-a-go-go相關基因(hERG)通道之HEK293細胞，來研究化合物(V)對於心室再極化過程中擔負重要角色之延遲整流K<sup>+</sup>電流(I<sub>Kr</sub>)之作用。

使用全自動膜片箝制系統(automated patch clamp system)(PatchXpress7000A, Axon Instruments Inc.)，依全細胞膜片箝制(whole cell patch clamp)法將細胞保

持於-80 mV之膜電位。記錄以+40 mV之去極化脈衝刺激2秒，並進一步，以-50mV之再極化脈衝刺激2秒所誘發的IKr。產生的電流安定後，將以含目標濃度的化合物(V)之細胞外液(NaCl：135 mmol/L、KCl：5.4 mmol/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>：0.3 mmol/L、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O：1.8 mmol/L、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O：1 mmol/L、葡萄糖：10 mmol/L、HEPES(4-(2-羥基乙基)-1-哌啶乙磺酸：10 mmol/L、pH值=7.4)於室溫下施用於細胞10分鐘。由所記錄的IKr，使用分析軟體(DataXpress ver.1, Molecular Devices Corporation)、以靜止膜電位之電流值為基準而測量尾尖峰電流之絕對值。進而，算出施用化合物(V)前之對尾尖峰電流之抑制率，與載體(vehicle)施用組(0.1%二甲基亞砒溶液)進行比較以評價化合物(V)對IKr之影響。

(結果)

以下表示0.3至10 μmol/L的化合物之抑制率。

化合物(V)： 7.9%

#### 【0080】測試實施例9：溶解度測試

化合物(V)之溶解度係於1%DMSO添加條件下決定。用DMSO製備10 mmol/L化合物溶液，且2 μL的化合物(V)溶液分別添加至198 μL的JP-1溶液(氯化鈉2.0 g、鹽酸7.0 mL及水以達到1000mL)及JP-2溶液(使磷酸二氫鉀3.40g及無水磷酸氫二鈉3.55g溶解於水中以達到1000mL，接著將其之1容量添加至水1容量)。於室溫下振盪1小時後，對混合物進行過濾。用甲醇/水=1/1(V/V)對濾液進行10倍稀

釋，且藉由絕對校準曲線法使用LC/MS來測定濾液中的化合物濃度。

(結果)

化合物(V)： 42.2  $\mu\text{mol/L}$

**【0081】 測試實施例10：粉末溶解度測試**

將化合物(V)放置至適當的容器內。添加200  $\mu\text{L}$ 的JP-1溶液(氯化鈉2.0 g、鹽酸7.0 mL及水以達到1000 mL)、200  $\mu\text{L}$ 的JP-2溶液(添加水500 mL至50 mL的磷酸鹽緩衝液(pH 6.8))及200  $\mu\text{L}$ 的20 mmol/L的牛膽酸鈉(TCA)/JP-2溶液(TCA 1.08g及水以達到100 mL)至各自的容器。設若化合物(V)於添加至測試溶液後全部溶解，適當追加化合物(V)。使容器密閉，並於37°C下振盪1小時。將混合物過濾，且添加甲醇100 $\mu\text{L}$ 至各濾液(100  $\mu\text{L}$ )以使濾液2倍稀釋。稀釋率係視需要進行變更。觀察稀釋的氣泡及析出物，然後使容器密閉並進行振盪。藉由HPLC、以絕對校準曲線法來執行定量。

(結果)

化合物(V)： JP-1溶液； 7.1  $\mu\text{g/mL}$ ， JP-2溶液4.4  $\mu\text{g/mL}$ ， 20 mmol/L TCA/JP-2溶液16.1  $\mu\text{g/mL}$

**【0082】 測試實施例11安氏試驗**

安氏試驗係使用沙氏桿菌(鼠傷寒沙氏桿菌(*Salmonella typhimurium*))TA98、TA100、TA1535及TA1537及大腸桿菌WP2uvrA作為試驗菌株，於利用預孵育法之代謝活化或非代謝活化下實施安氏試驗，調查本發



明之化合物有無基因致突變性。

(結果)

化合物(V)： (-)

**【0083】 測試實施例12：光溶血試驗**

使化合物(V)以預定濃度溶解且於微量盤上與自綿羊之綿羊脫纖維血製備之0.1至0.0008%之紅血球懸浮液(2.5 v/v%)進行混合。使用紫外線螢光燈(GL20SE燈，Sankyo Denki及FL20S-BLB燈，Panasonic)進行UVA及UVB區域之光照射(10 J/cm<sup>2</sup>、290-400 nm)。採集照射後之混合溶液且進行離心。離心後，採集上清液並移至微量盤，以及測定上清液之吸光度(540或630 nm)。540及630 nm之吸光度係分別使用作為活體膜損傷(光溶血%)及脂質膜過氧化(變性血紅素產生)之指標。(-)：光溶血率小於10%且630nm下之吸光度之變化小於0.05；(+)：光溶血率為10%或更大且630nm下之吸光度之變化為0.05或更大。

(結果)

化合物(V)： (-)

**【0084】** 圖7及圖8表示於非禁食條件下經口投與化合物(VI)至大鼠後，化合物(V)及其前驅藥化合物(VI)之血漿內濃度的時間過程。

血漿樣本內化合物(VI)之濃度低於定量界限，表示化合物(V)之前驅藥化合物(VI)於投與後在活體內迅速地轉化成化合物(V)(參照圖8)。

**【0085】** 此等試驗結果顯示前驅藥化合物於經口投

與後被吸收至體內而於血中迅速地轉化成其母化合物。因此，化合物(V)及(VI)可作為由於感染流行性感冒病毒而誘發之症狀及/或疾病之治療及/或預防有用的藥物。

**【0086】 測試實施例13：靜脈內投與測試**

材料與方法

(1)測試動物：SD大鼠

(2)飼養條件：使SD大鼠自由攝取固體飼料及滅菌自來水。

(3)劑量及編組：按照預定劑量進行靜脈內投與。以下述方式編組(每種化合物劑量可變更)。

靜脈內：0.5至1 mg/kg (n = 2至3)

(4)投與液之製備：經溶解用於靜脈內投與。

(5)投與方法：用附帶注射針之注射器自尾靜脈進行。

(6)終點：經時採血，以及用LC/MS/MS來測定化合物(V)之血漿濃度

(7)統計分析：全身清除率(CL<sub>tot</sub>)及消除半衰期(t<sub>1/2, z</sub>)係用非線性最小平方法程式WinNonlin™、從化合物(V)血漿內濃度的時間過程算出。

(結果)

化合物(V)：

CL<sub>tot</sub>：16.4 mL/min/kg

t<sub>1/2, z</sub>：3.4小時

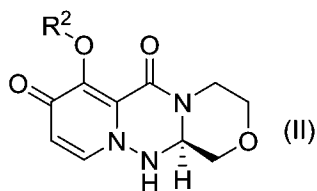
以上之結果顯示化合物(V)具有低的全身清除率及長的半衰期。

因此，化合物(V)可為持續性優異的藥物且可作為由於感染流行性感冒病毒而誘發之症狀及/或疾病之治療及/或預防有用的藥物。

**【0087】** 本發明的化合物及方法可用於作為一種中間物，用於生產由於感染流行性感冒病毒而誘發之症狀及/或疾病之治療及/或預防有用的藥物。依據本發明之方法，式(V)之化合物及式(VI)之化合物可有效率地生產。

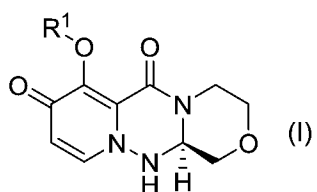
## 【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種用於製備式(II)之一化合物的方法：



其中 $R^2$ 為未經取代烷基；

其特徵在於，在一鈉鹽及/或一鎂鹽的存在下使式(I)之一化合物與式： $R^2-OH$ ，之一化合物反應：



其中 $R^1$ 為氫，或不同於未經取代烷基之一保護基， $R^2$ 係如以上所定義。

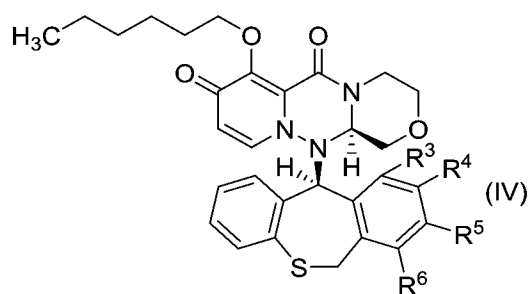
【第2項】 如請求項1之方法，其中該反應係於一鎂鹽的存在下進行。

【第3項】 如請求項1之方法，其中該反應係於異丙基氯化鎂的存在下進行。

【第4項】 如請求項1至3中任一項之方法，其中 $R^1$ 為苄基。

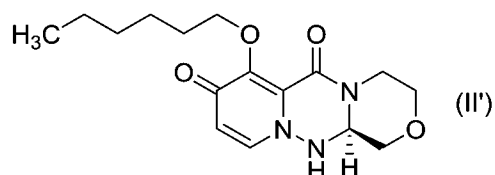
【第5項】 如請求項1至4中任一項之方法，其中 $R^2$ 為己基。

【第6項】 一種用於製備式(IV)之一化合物的方法：

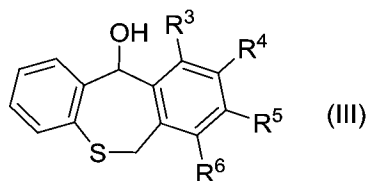


其中 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 各自獨立地為氫或鹵素，但條件是 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 中之一者或二者為鹵素；

其特徵在於，使式(II')之一化合物：



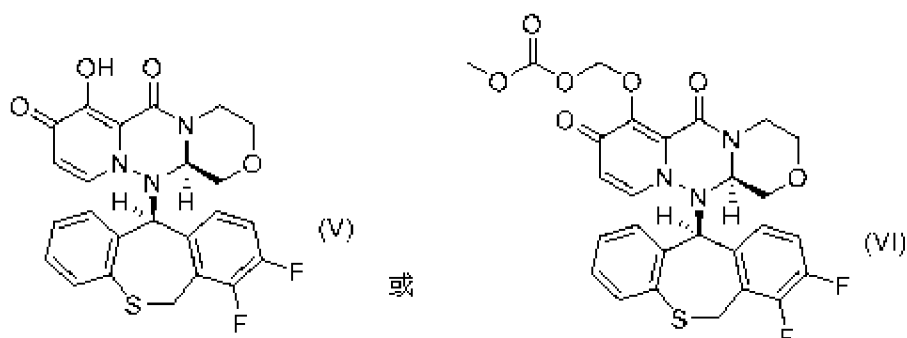
與式(III)之一化合物反應：



其中 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 係如以上所定義。

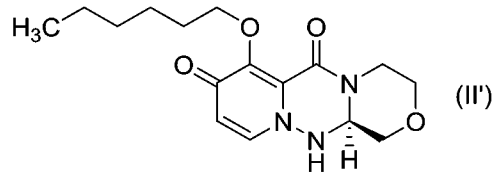
【第7項】 如請求項6之方法，其中 $R^3$ 為氫， $R^4$ 為氫， $R^5$ 為氟，以及 $R^6$ 為氟。

【第8項】 一種用於製備式(V)或式(VI)之化合物的方法：



其包含如請求項1至7中任一項之方法。

【第9項】 一種式(II')之化合物：

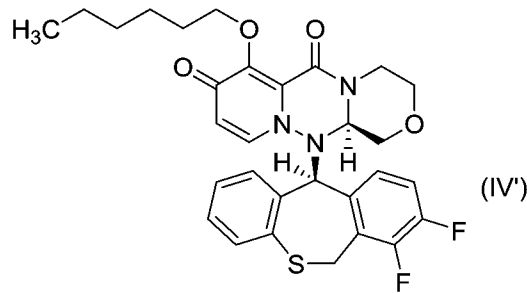


或一其鹽。

【第10項】 如請求項9之化合物之該鹽，其為一甲磺酸鹽。

【第11項】 一種如請求項10之鹽的結晶。

【第12項】 一種式(IV')之化合物：

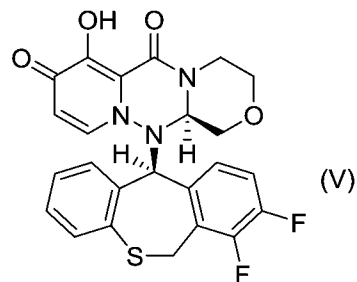


或一其鹽。

【第13項】 如請求項12之化合物之該鹽，其為一甲磺酸鹽(mesylate)。

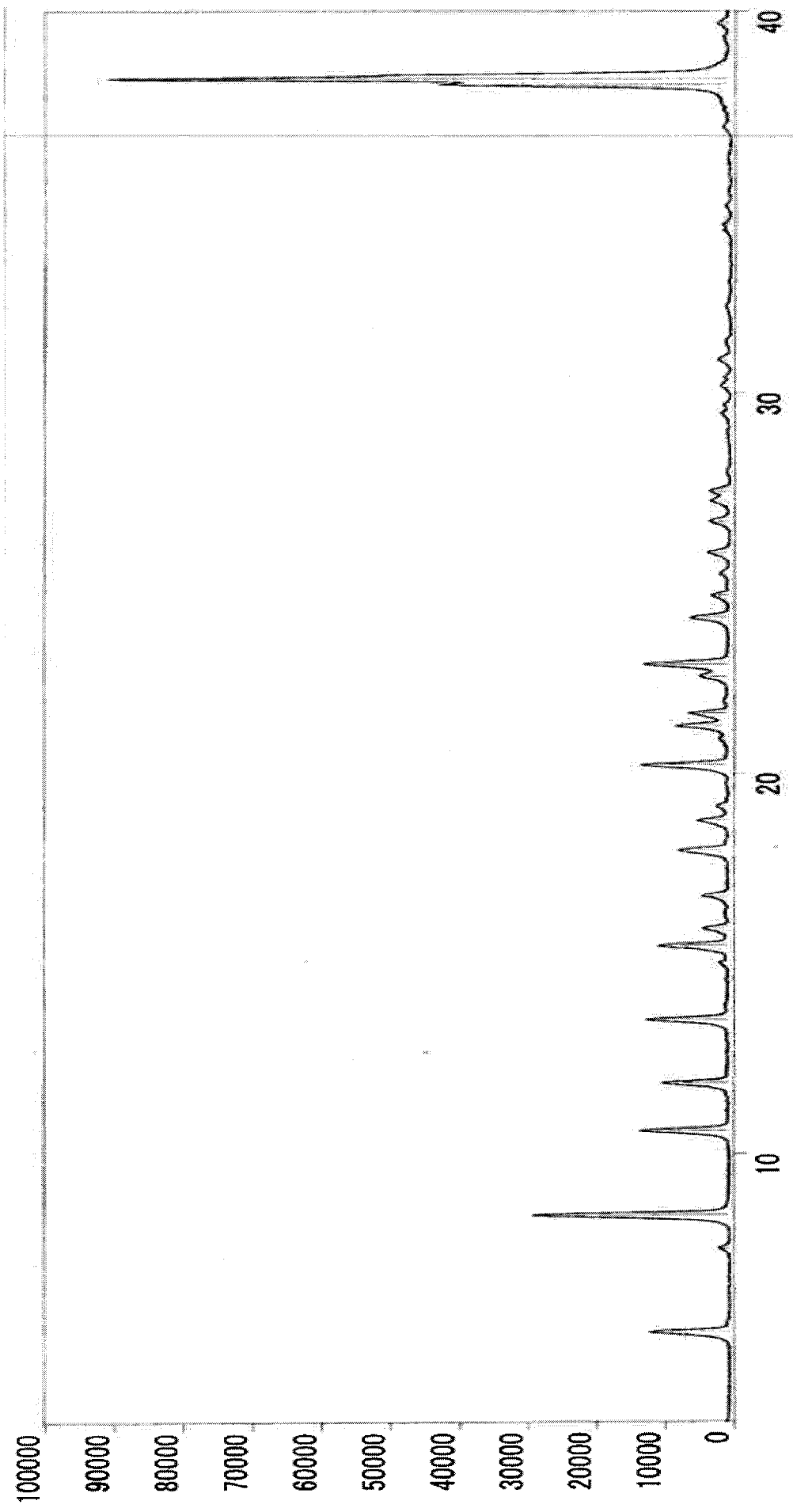
【第14項】 一種如請求項13之鹽的結晶。

【第15項】 一種式(V)之化合物的結晶：

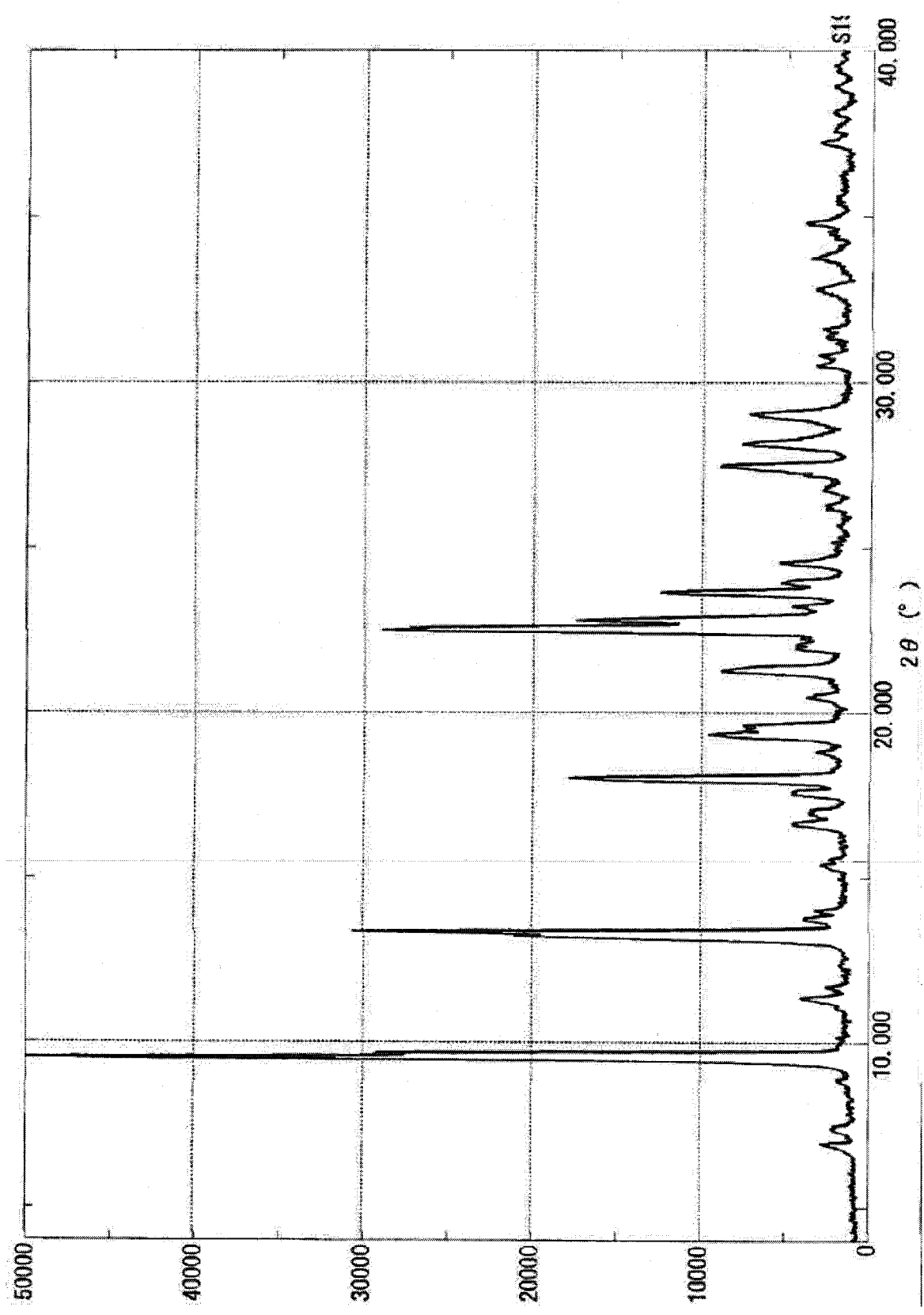


或其之一藥學上可接受的鹽之一結晶。

【發明圖式】

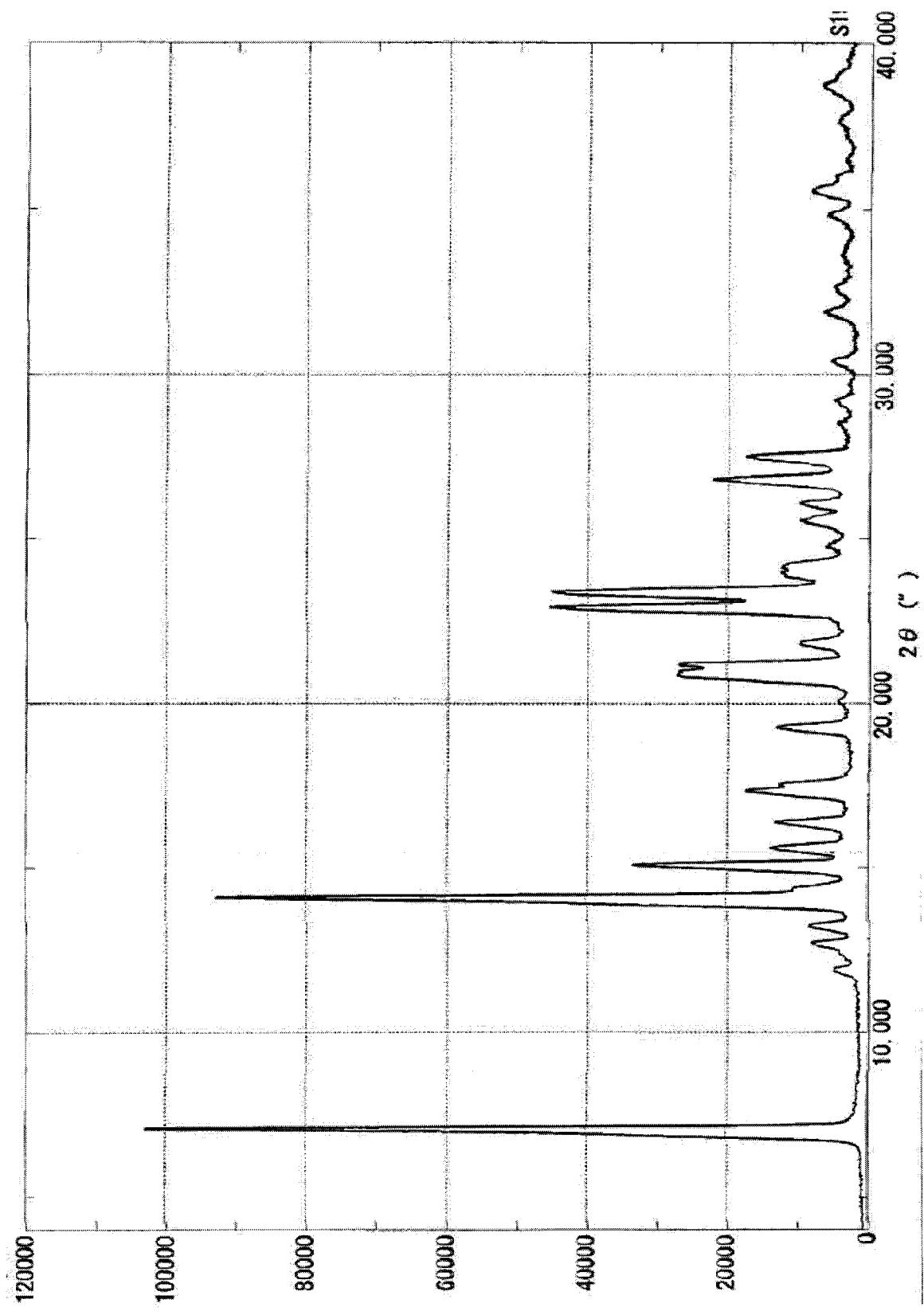


【圖1】

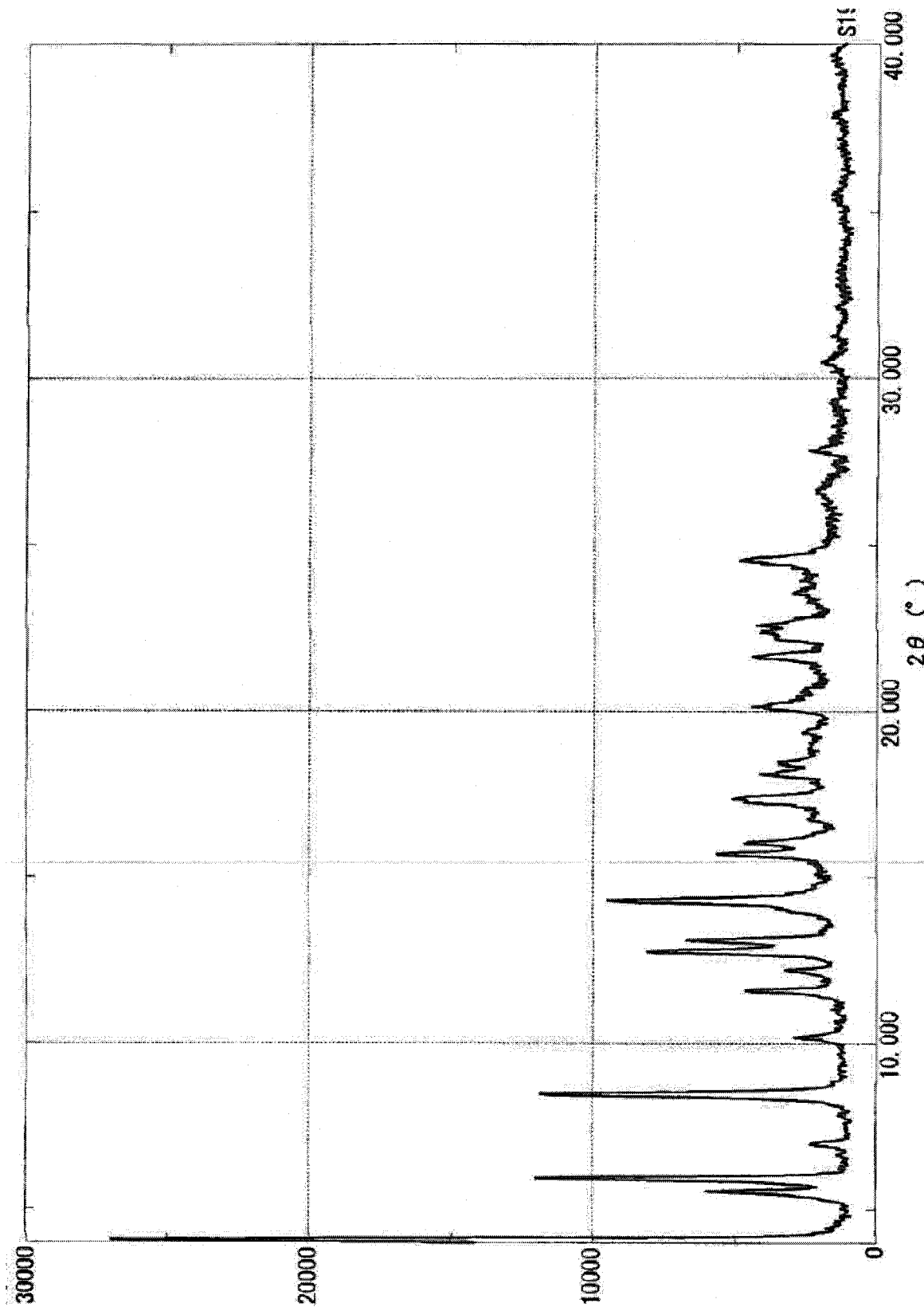


【圖2】

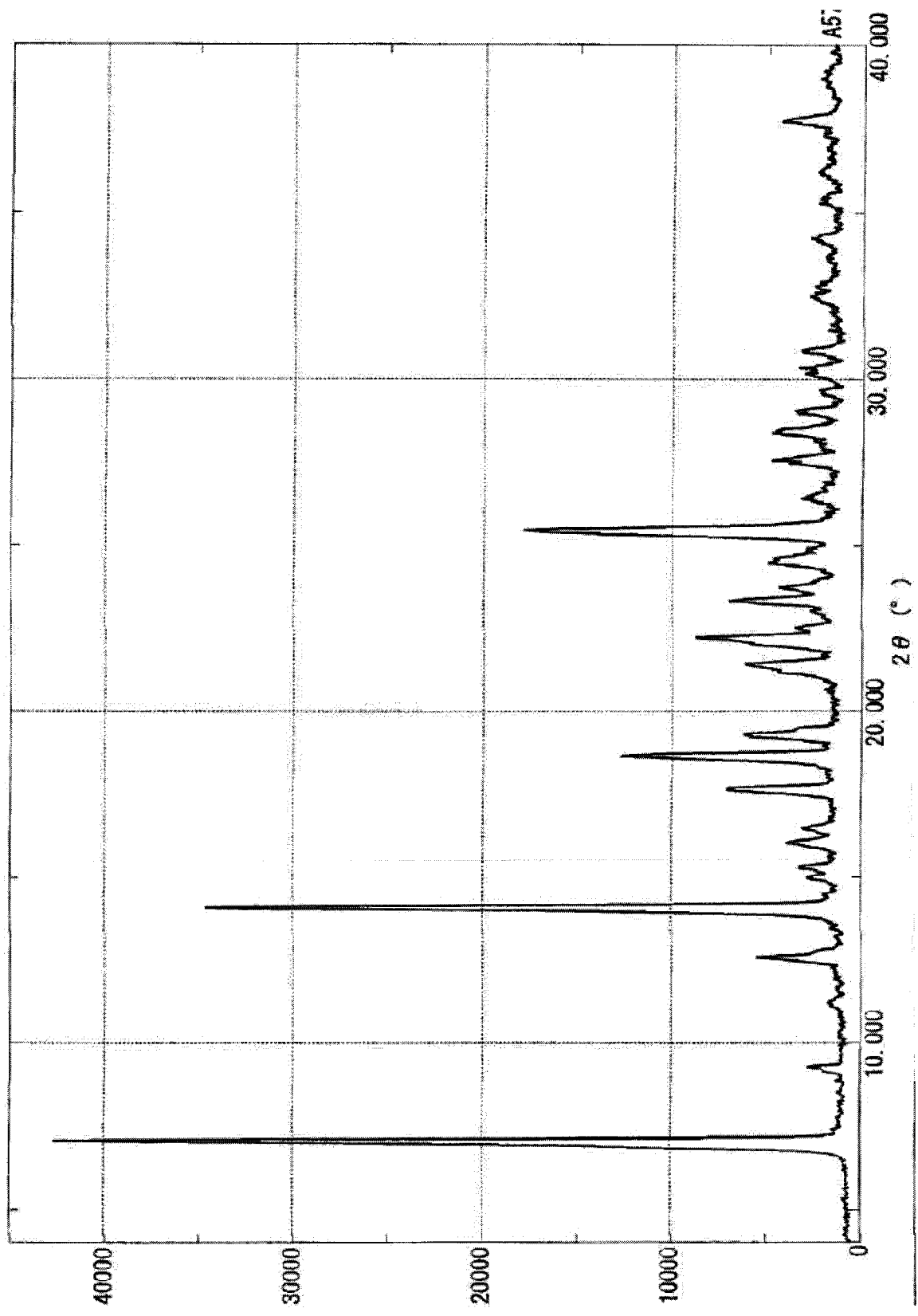




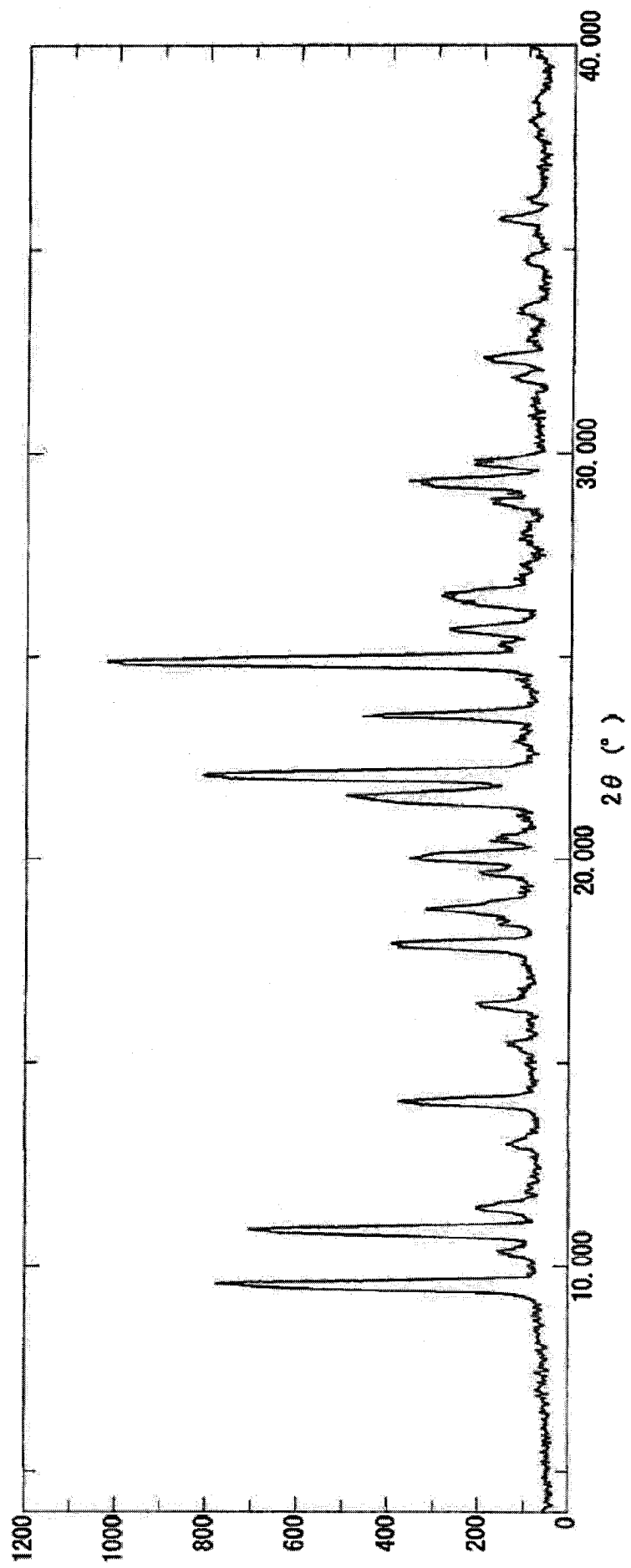
【圖3】



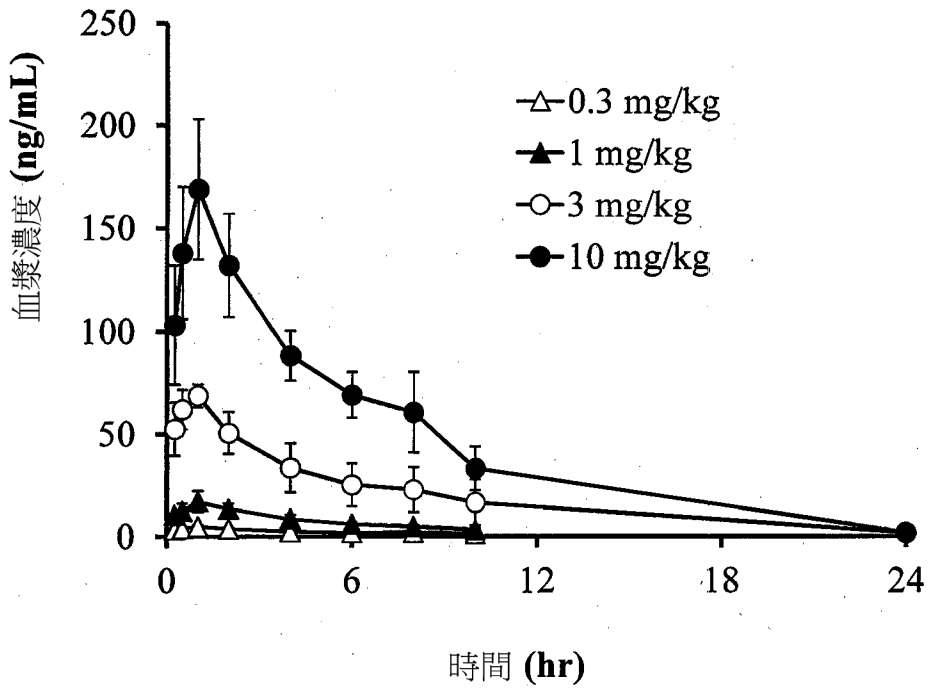
【圖4】



【圖5】



【圖6】



【圖7】

時間 (hr)	血漿濃度 (ng/mL)			
	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
0.25	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
4	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
10	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ: 低於定量下限(<0.500 ng/mL)

【圖8】